

**Ein transgenes Tiermodell
zur Untersuchung der Funktion von Cyclooxygenase-2
in normaler und neoplastischer Epidermis**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Gitta Neufang
geboren am 23. Januar 1973, in Ludwigshafen am Rhein

2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Biochemie der gewebsspezifischen Regulation von Herrn Prof. Dr. F. Marks am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg durchgeführt.

Referent: Prof. Dr. W. Müller
Medizinische Hochschule Hannover

Korreferent: Prof. Dr. F. Marks
DKFZ, Heidelberg

Tag der Promotion: 9. Juli 2001

Teile der Arbeit wurden veröffentlicht in

G. Neufang, G. Fürstenberger, M. Heidt, F. Marks, and K. Müller-Decker (2001)
Abnormal differentiation of epidermis in transgenic mice constitutively expressing cyclooxygenase-2 in skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 7629-7634

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Der Eicosanoidstoffwechsel	7
2.2 Cyclooxygenasen (COX)	10
2.3 COX und Krebs	10
2.4 Die Haut als Modellsystem	11
2.4.1 Übersicht	11
2.4.2 Aufbau der Epidermis	12
2.4.3 Morphogenese der Epidermis	14
2.4.4 Aufbau des Haarfollikels	15
2.4.5 Morphogenese des Haarfollikels	17
2.4.6 Der Haarzyklus	19
2.4.7 Talgdrüsen	20
2.4.8 Das Mehrstufenmodell der Hautkarzinogenese	21
2.4.9 Cyclooxygenasen in normaler und neoplastischer Haut	22
2.5 Zielsetzung	24
3 Material	25
3.1 Geräte	25
3.2 Laborchemikalien	26
3.3 Radiochemikalien	27
3.4 Membranen und Filme	27
3.5 Bakterien, Tiere, Zelllinien	28
3.5.1 Kompetente Bakterien	28
3.5.2 Mäuse-Stämme	28
3.5.3 Zelllinien	28
3.6 Chemikalien und Materialien für die Immunhistochemie	28

3.7 Antikörper	29
3.7.1 Primäre Antikörper	29
3.7.2 Sekundäre Antikörper	29
3.8 Proteinanalytik	30
3.9 Lipidanalytik	30
3.10 Molekularbiologische Reagenzien und Kits	30
3.11 Plasmid und cDNAs	31
3.12 Synthetische Oligonukleotide	31
3.12.1 Oligonukleotide für die Überprüfung der genomischen Integration	31
3.12.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung, PCR und RT-PCR	32
3.13 Bakterienmedien	32
3.14 Medien und Lösungen für die Zellkultur	33
3.15 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologischen Methoden	35
3.15.1 Plasmid-Minipräparation	35
3.15.2 Plasmid-Maxipräparation	35
3.15.3 Gelextraktion	35
3.15.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	36
3.15.5 DNA-Agarosegelelektrophorese	36
3.15.6 RNA-Agarosegelelektrophorese	36
3.15.7 Nukleinsäuretransfer	36
3.15.8 Hybridisierung von Nukleinsäuren	36
3.16 Lösungen für Tierversuche	37
3.17 Lösungen für biochemische Methoden	37
3.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
3.17.2 Western-Transfer	37
3.17.3 Immunblot-Nachweis von Proteinen	37
3.17.4 Homogenisierungspuffer	38

4 Methoden	39
4.1 Molekularbiologische Methoden	39
4.1.1 DNA-Isolierung	39
4.1.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	39
4.1.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	39
4.1.1.3 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien	40
4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	40
4.1.3 Restriktionsanalyse	40
4.1.4 DNA-Agarosegelelektrophorese	41
4.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	41
4.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	42
4.1.7 Sequenzierung mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer	43
4.1.8 Aufreinigung von PCR-Fragmenten	43
4.1.9 Klonierungsmethoden	44
4.1.9.1 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase	44
4.1.9.2 Ligation	44
4.1.9.3 Transformation von Bakterien	44
4.1.9.4 TOPO-TA-Klonierung	45
4.1.10 RNA-Isolierung aus Zellen	45
4.1.11 RNA-Isolierung aus Gewebe	46
4.1.12 RNA-Agarosegel	46
4.1.13 Nukleinsäuretransfermethoden	46
4.1.13.1 Northern Transfer	46
4.1.13.2 Southern Transfer	47
4.1.13.3 Hybridisierung	47
4.1.13.4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	48
4.1.14 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)	48
4.2 Transfektionsmethoden	49
4.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion	49
4.2.2 Poly-Ornithin-Transfektion	49
4.2.3 Selektion stabil transfizierter Zellen	49
4.2.4 β -Galactosidase-Test	50
4.3 Proteinchemische Methoden	50
4.3.1 Immunpräzipitation	50
4.3.1.1 Waschen und Aliquotieren der Protein-G-Sepharose	51
4.3.1.2 Herstellung von Gewebshomogenaten	51
4.3.1.3 Immunpräzipitation von COX-Isoenzymen	51

4.3.2	Immunblotnachweis	52
4.3.2.1	Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli	52
4.3.2.2	Western-Transfer	53
4.3.2.3	Nachweis mit dem Tropix [®] -Western-Light-Chemilumineszenz-Kit	53
4.3.3	Proteinbestimmung mit dem DC-Protein-Assay	54
4.4	Histologische Färbemethoden	54
4.4.1	Einbetten von Gewebe	54
4.4.2	Hämatoxylin/Eosin-Färbung	55
4.4.3	Lipid-Färbung mit Oil Red O	55
4.4.4	Immunhistochemie	56
4.4.5	Indirekte Immunfluoreszenz	57
4.5	Lipidanalytik	58
4.5.1	Lipidextraktion aus wässrigen Lösungen	58
4.5.2	Lipidextraktion aus Maushaut	58
4.5.3	PGE ₂ -Extraktion aus Blutplasma	59
4.5.4	Festphasenextraktion nach Powell	59
4.5.5	Bestimmung der PGE ₂ /PGF _{2α} -Konzentration	60
4.5.6	Bestimmung der 6-Keto-PGF _{1α} -Konzentration	60
4.6	Generierung und Zucht transgener Mäuse	61
4.6.1	Vorbereitung des Mikroinjektionskonstrukts	61
4.6.2	Mikroinjektion und Embryotransfer	61
4.6.3	Zucht der transgenen Linien	61
4.6.4	Tierhaltung	62
4.7	Tierversuche	62
4.7.1	Gewinnung von Blutplasma	62
4.7.2	Ohrödeme	62
4.7.3	Messung der epikutanen Sebumkonzentration	63
4.7.4	Futtermittelversuch mit selektiven COX-2-Inhibitoren	63
4.7.5	Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut	63

5 Ergebnisse	65
5.1 Das Keratin 5-Promotor-Konstrukt	66
5.1.1 Überprüfung der Maus-COX-2-cDNA	66
5.1.2 Klonierung und Überprüfung des K 5-COX-2-Konstruktes	68
5.1.3 Expression des K 5-COX-2-Konstruktes in BMGE ⁺ -Zellen	70
5.2 Generierung der K 5-COX-2-transgenen Mäuse	72
5.2.1 Identifizierung der Founder-Tiere	72
5.2.2 Zucht von heterozygot transgenen Linien	75
5.2.3 Zucht homozygoter Tiere	76
5.3 Charakterisierung der K 5-COX-2-transgenen Mäuse	79
5.3.1 Expression der transgenen mRNA	79
5.3.2 COX-2-Proteinexpression in K 5-COX-2-transgenen Mäusen	82
5.3.3 Immunhistochemischer Nachweis der COX-Isoenzyme in Schwanzhaut	84
5.3.4 Prostaglandin-Nachweis in Epidermis und Blutplasma	87
5.4 Phänotyp der K 5-COX-2-transgenen Mäuse	89
5.5 Postnatale Morphogenese der Rückenepidermis und der Haarfollikel	91
5.5.1 Haarwachstum in transgener Rückenhaut	91
5.5.2 Haarfollikeldichte in COX-2-transgener Rückenhaut	93
5.5.3 Postnatale Verdünnung der interfollikulären Epidermis	94
5.5.4 COX-Isoenzymexpression in neonataler Haut	97
5.6 Talgdrüsenhyperplasie in COX-2-transgener Haut	98
5.7 Morphologische Veränderungen in Schwanzhaut von COX-2-transgenen Mäusen	103
5.7.1 Epidermale Hyperplasie	103
5.7.2 Dysplastische Strukturen	105
5.7.3 Proliferationsaktivität in interfollikulärer Epidermis	107
5.7.4 Terminale Differenzierung der COX-2-transgenen Schwanzepidermis	109
5.7.5 Blutgefäßdichte	111
5.7.6 Haarfollikelanomalien	113
5.8 Effekte von COX-2-Inhibitoren auf den transgenen Phänotyp	115

5.9 Ohrödemtest	120
5.9.1 Ödeme in unbehandelten Ohren	120
5.9.2 Ödeme in chemisch stimulierten Ohren	122
5.10 Effekt des K 5-COX-2-Transgens auf die Induktion von epidermalen Tumoren	125
6 Diskussion	127
6.1 Charakterisierung der K 5-COX-2-transgenen Linien	127
6.2 Einfluß der konstitutiven COX-2-Expression auf Entzündungsprozesse in der Haut	130
6.3 COX-2-Expression und Talgdrüsenhyperplasie	131
6.4 Effekte der K 5-gesteuerten COX-2-Expression auf Haarfollikelmorphogenese und Haarwachstum	132
6.5 Störung der terminalen Differenzierung in K 5-COX-2-transgener Schwanzhaut	135
6.6 COX-2-Expression und Vaskularisierung	137
6.7 COX-2-Expression und epidermale Tumorentwicklung in der Maushaut	138
7 Literaturverzeichnis	140
8 Anhang	156

1 Zusammenfassung

Expression und Aktivierung von Cyclooxygenasen 2 (COX-2) in basalen Keratinozyten sind charakteristisch für die hyperplastische Transformation der Haut und die Entstehung epithelialer Hauttumore der Maus und des Menschen. Zur funktionellen Charakterisierung von COX-2 in der Epidermis wurden hetero- und homozygote transgene Mauslinien hergestellt, die dieses Enzym unter der Kontrolle des bovinen Keratin 5-Promotors in den basalen Zellen der interfollikulären Epidermis, der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels und des peripheren Talgdrüsenepithels konstitutiv exprimierten.

Transgene Expression von COX-2 (Nachweis über PCR und durch Immunhistochemie und Immunblot) korrelierte mit einem erhöhten Prostaglandinspiegel in Epidermis und Blutplasma sowie mit ausgeprägten phänotypischen Veränderungen. Die heterozygoten Tiere waren fertil. Bei einigen transgenen Mäusen war die Lebensdauer durch das Auftreten von Pankreatitis im Alter von 10 Monaten eingeschränkt.

Schon 9 Tage alte transgene Jungtiere unterschieden sich von ihren Wildtyp-Geschwistern durch ihr kahles Aussehen, bedingt durch eine verzögerte Haarfollikelmorphogenese, die mit einer verzögerten Umwandlung der neonatalen Epidermis in den adulten Phänotyp einherging. Die Haarfollikeldichte in transgener Haut war deutlich erniedrigt.

Das fettig-struppige Fell der transgenen Tiere war die Folge einer Talgdrüsenhyperplasie in Rücken- und Schwanzhaut, die mit einer erhöhten Produktion von Sebum gekoppelt war, das sich epikutan anreicherte.

In Schwanzhaut induzierte die transgene COX-2-Expression im proximalen Teil der Haarfollikel die Bildung neuer Haarkeime, was sich in lateralen Sprossungen und Aufspaltungen des proximalen Follikelbereiches manifestierte.

In den parakeratotischen Schuppen der Schwanzepidermis etablierte sich bereits bei 7 Wochen alten transgenen Tieren eine mit zunehmendem Alter stärker werdende Hyperplasie, die durch die vermehrte Anzahl lebender und verhornter Zellschichten (Hyperkeratose) gekennzeichnet war. Messungen des Proliferationsindex (Ki67-Nachweis) und der Expression differenzierungsspezifischer Proteine zeigten, daß diese Gewebsreaktion eher auf eine verzögerte terminale Differenzierung als auf eine erhöhte Proliferationsaktivität der Epidermis zurückzuführen war.

Erstmals konnte gezeigt werden, daß eine aberrante Expression von COX-2 zu Gewebsdysplasie führt. So waren ein Verlust der basalen Zellpolarität, die Bildung von Hornperlen und endophytisch-papilläres Wachstum nachweisbar. Parallel dazu war die subepidermale Blutgefäßdichte in transgener Haut erhöht.

Eine verstärkte Blutgefäßpermeabilität war auch für die ödematöse Verdickung der transgenen Ohrhaut verantwortlich. Bei chemisch-induzierten Hautentzündungen schien COX-2 stimulusabhängig zu wirken. Während bei der Arachidonsäure-induzierten Entzündungsre-

aktion kein Einfluß der COX-2 nachweisbar war, wurde bei der TPA-induzierten Entzündungsreaktion zeitabhängig in der frühen Entzündungsphase ein pro-inflammatorischer, in der späten Phase hingegen ein anti-inflammatorischer Effekt festgestellt.

Eine Behandlung der Tiere mit selektiven COX-2-Inhibitoren unterdrückte den transgenen Phänotyp nahezu vollständig und belegte so den kausalen Zusammenhang zwischen transgener COX-2-Expression und den beschriebenen Anomalien.

Bei der Induktion von epithelialen Tumoren nach dem Initiations-Promotions-Protokoll (DMBA-TPA-Behandlung) zeigten transgene Mäuse nach anfänglicher Verzögerung eine ähnliche Tumorantwort wie der Wildtyp. Jedoch nach Initiation allein, d.h. nach einmaliger Behandlung mit DMBA ohne weitere Behandlung mit dem Tumorpromotor TPA, bildeten nur die transgenen, nicht aber Wildtyp-Mäuse Tumore. Dieses Ergebnis zeigt eine onkogene, genauer gesagt autopromovierende Wirkung von COX-2 in initiiertem Maushaut und bestätigt damit Resultate früherer toxikologisch-biochemischer Versuche, die einen kausalen Zusammenhang zwischen COX-2-katalysierter Prostaglandin-Synthese und Tumorpromotion nahegelegt hatten.

Schlagwörter: Cyclooxygenase, Haut, Differenzierung

1 Abstract

Expression and activity of cyclooxygenase-2 (COX-2) in basal keratinocytes are consistent features of the hyperplastic transformation of the epidermis and the development of epithelial tumors in mouse and human skin. In order to analyze the *in vivo* function of COX-2 in epidermis transgenic mouse lines were bred expressing this enzyme under the control of the bovine keratin 5 (K 5) promoter in basal cells of the interfollicular epidermis, the outer root sheath of the hair follicle, and the sebaceous gland epithelium.

The K 5-directed expression of COX-2 (controlled by PCR-analysis, immunoblotting and immunohistochemistry) corresponded with increased prostaglandin levels in epidermis and blood plasma, with pronounced phenotypic alterations. At the age of 10 month some transgenics suffered from severe pancreatitis shortening their life expectancy.

Already 9-day-old transgenic mice were distinguishable from their wild-type littermates by a sparse coat which was due to a retardation of hair follicle morphogenesis accompanied by a delayed thinning of neonatal epidermis towards the adult phenotype. The density of hair follicles was significantly reduced in transgenic back skin. The rough and greasy fur of transgenic mice resulted from sebaceous gland hyperplasia and increased amounts of epicutaneous sebum. Sebaceous gland hyperplasia was most pronounced in tail and back skin.

In tail skin transgenic COX-2 expression induced the formation of new non-functional hair germs in the proximal part of the hair follicle. Due to a disturbed terminal differentiation (characterized by the Ki67-proliferation index of the epidermis and the expression of differentiation-specific proteins) 7 week-old transgenic mice developed a severe hyperplasia in the parakeratotic scale region of tail epidermis. This hyperplasia consisting of an extended number of living and cornified cell layers (hyperkeratosis) increased with age. For the first time it has been shown that dysplastic alterations including a loss of basal cell polarity, formation of horn pearls and endophytic papillary growth and correlating with an extended subepidermal blood vessel density are a consequence of an aberrant COX-2-expression.

Inhibition of COX-2-catalyzed prostaglandin synthesis correlated with the suppression of the transgenic phenotype demonstrating a causal relationship between transgenic COX-2 expression and the alterations described.

Increased permeability of dermal blood vessels caused an edema in transgenic ear epidermis. Transgenic COX-2 expression had no influence on the inflammatory edema induced by arachidonic acid, while a time-dependent effect was observed for TPA-induced edema, showing a proinflammatory activity in the early and an anti-inflammatory activity in the late phase of ear edema formation.

Epithelial tumor development induced according to the initiation-promotion-protocol (DMBA-TPA-application) yielded a similar papilloma response in wild-type and transgenic mice with some retardation in the latter. Upon initiation only, i.e. after a single epicuta-

neous application of DMBA without subsequent treatment with the tumor promoter TPA, significant papilloma formation was observed in transgenic but not in wild-type mice. These results point to an oncogenic, i.e. auto-promoting efficacy of constitutively expressed COX-2 in initiated mouse skin confirming earlier toxicological-biochemical experiments, which had revealed an causal relationship between COX-2-catalyzed prostaglandin-synthesis and skin tumor promotion.

Key words: cyclooxygenase, skin, differentiation

2 Einleitung

Die beiden Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2 katalysieren den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Prostaglandin- und Thromboxan-Synthese. Eine aberrante Expression von COX-2 ist ein typisches Kennzeichen epithelialer Neoplasien von Tier und Mensch und wird von vielen Autoren als ein charakteristisches Ereignis bei der Krebsentstehung angegeben. Das Protokoll der Mehrstufenkarzinogenese in der Maushaut hat sich als besonders geeignet erwiesen, biochemische und molekularbiologische Prozesse bestimmten Stadien der Tumorgenese zuzuordnen. Mit Hilfe dieses in vivo Systems wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von COX-2 in normaler Haut und bei der epidermalen Tumorentwicklung untersucht. Hierzu wurden transgene Mäuse erzeugt, die COX-2 konstitutiv und spezifisch in der Epidermis exprimieren.

2.1 Der Eicosanoidstoffwechsel

Die Eicosanoide bilden eine große Gruppe von biologisch aktiven Substanzen, die sich von der 4-fach ungesättigten C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure (5, 8, 11, 14-Eicosatetraensäure) oder chemisch verwandten mehrfach ungesättigten Fettsäuren ableiten. Von nicht-enzymatischer Oxidation abgesehen (Morrow und Roberts, 1997) wird die Biosynthese von Eicosanoiden gewebs- und zelltypspezifisch durch Cytochrom-P₄₅₀-abhängige Monooxygenasen (Schwartzman und McGiff, 1997) sowie durch Lipoxygenasen (LOX) und Cyclooxygenasen (COX) katalysiert (Abb. 1).

Als lokal wirkende Gewebshormone besitzen Eicosanoide in der Regel eine kurze, im Sekundenbereich liegende Halbwertszeit. Diese resultiert aus struktureller Instabilität (Granström und Kumin, 1987) und rascher enzymatischer Inaktivierung, z.B. durch Hydroxylierung (Hammerström, 1983) oder Dehydrogenierung mit anschließender ω -Oxidation (Ensor und Tai, 1985). Ihre molekulare Wirkungsweise entfalten Eicosanoide extrazellulär über G-Protein-gekoppelte Oberflächenrezeptoren, welche die Bildung von sekundären Botenstoffen wie Ca²⁺, Diacylglycerin, Inositol-1,4,5-trisphosphat und cAMP regulieren, oder intrazellulär als Liganden von Transkriptionsfaktoren, den sogenannten Peroxisomenproliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) (Piomelli und Greengard, 1990; Kliewer et al., 1995; Foreman et al., 1996).

Eingeleitet wird die Eicosanoidbiosynthese durch die Freisetzung von Arachidonsäure aus der sn₂-Position von Phospholipiden der Plasmamembran (Ziboh, 1994). In Phospholipiden menschlicher Epidermis beträgt der Arachidonsäureanteil 9% der veresterten Fettsäuren (Vromen et al., 1969). Die Phospholipidhydrolyse wird hauptsächlich durch die hete-

rogene Enzymfamilie der Phospholipasen vom Typ A₂ (PLA₂) katalysiert. Aufgrund ihrer zellulären Lokalisation, Struktur, Substratspezifität und Calcium-Abhängigkeit unterscheidet man mehrere Unterfamilien wie die extrazellulär wirkenden sekretorischen PLA₂ (sPLA₂) und die intrazellulären PLA₂, zu denen die Ca²⁺-unabhängigen PLA₂ und die cytosolischen PLA₂ (cPLA₂) gehören. Letztere spalten selektiv Arachidonsäure aus der sn₂-Position ab (Roberts, 1996; Dennis, 1997; Lesslie, 1997; Tischfield, 1997).

Lipoxygenasen (LOX) bilden eine Enzymfamilie von Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen, die stereospezifisch die Addition eines Sauerstoffmoleküls an cis-cis-1,4 –Pentadienstrukturen ungesättigter Fettsäuren katalysieren (Nelson und Seitz, 1994). Aus Arachidonsäure entstehen dabei über instabile Monohydroperoxyeicosatetraensäuren (HPETen) zahlreiche Produkte mit Wirkstoffcharakter, z.B. die korrelierenden Monohydroxyeicosatetraensäuren (HETen) Leukotriene, Lipoxine und Hepoxilinen (Samuelson et al., 1993; Pace Asciak et al., 1995).

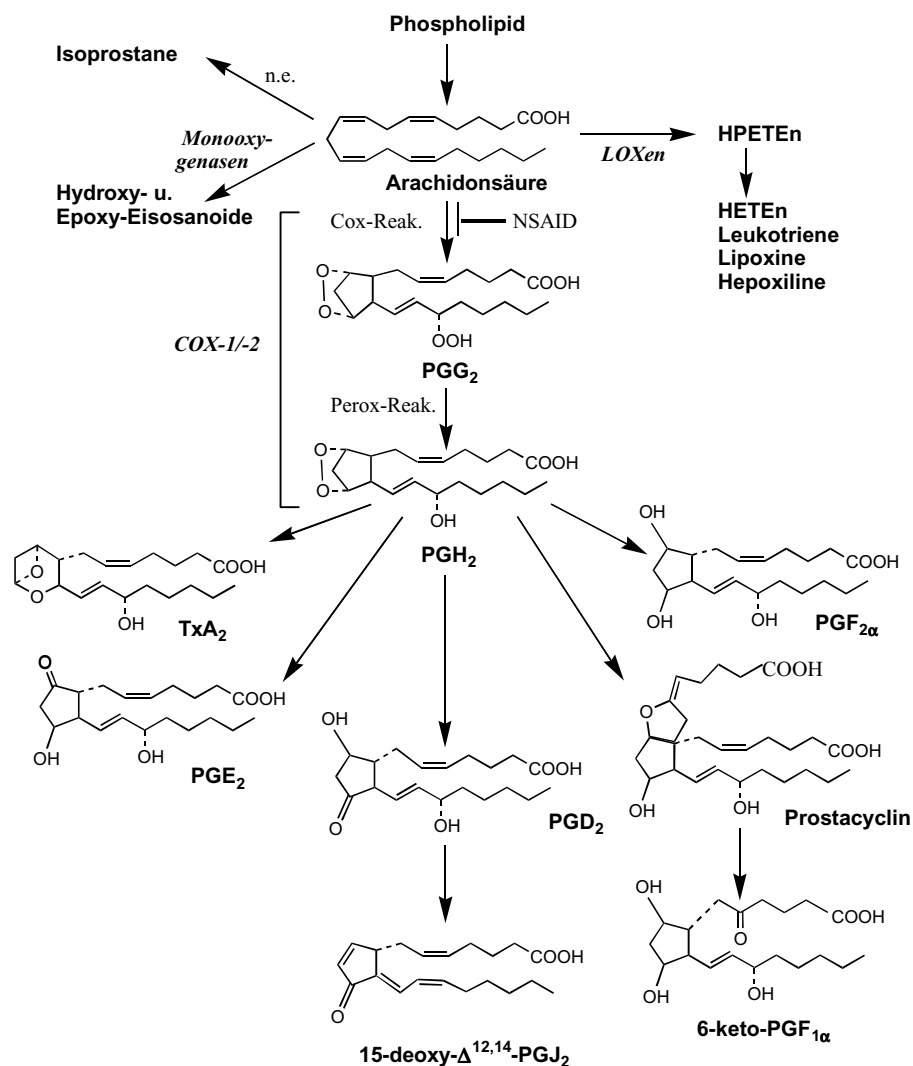


Abb. 1: Die Arachidonsäurekaskade

PLA₂ Phospholipase A₂, COX Cyclooxygenase, LOX Lipoxygenase, n.e. nicht enzymatisch

Die bekanntesten Eicosanoide sind die Prostanoiden. Es sind Produkte des COX-katalysierten Arachidonsäurestoffwechsels. Aus dem intermediär gebildeten Prostaglandin H_2 (PGH_2) werden zelltypspezifisch durch nachgeschaltete Enzyme die Prostaglandine PGD_2 , PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ und PGJ_2 , Prostacyclin (PGI_2) und Thromboxane (TXA_2) gebildet (Abb. 5).

Deregulationen des Eicosanoidstoffwechsels sind charakteristisch für eine Reihe von schweren Krankheitsbildern, insbesondere entzündliche Proliferationsstörungen, wie rheumatische Arthritis und neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Krebs (Crofford, et al., 1994; Kang et al., 1996; McGer et al., 1996). Neben einer Überproduktion bestimmter Eicosanoide scheint daran eine Vielzahl genschädigender Neben- und Zwischenprodukte des Arachidonsäurestoffwechsels wie Sauerstoff- und organische Radikale, sowie Malondialdehyd beteiligt zu sein (Marnett, 1994).

2.2 Cyclooxygenasen (COX)

Die Schlüsselreaktion der Prostanoid-Biosynthese, die Bildung von Prostaglandin H_2 (PGH_2) aus Arachidonsäure, wird von Cyclooxygenasen katalysiert. COX sind Hämproteine mit zwei voneinander unabhängigen Enzymaktivitäten: mit ihrer eigentlichen Cyclooxygenaseaktivität katalysieren sie die Oxidation von freier Arachidonsäure durch zwei Moleküle Sauerstoff zu dem zyklischen Endohydroperoxid PGG_2 , das durch die Peroxidaseaktivität der COX zu PGH_2 reduziert wird (Smith und Marnett, 1994).

Zwei COX-Isoenzyme, COX-1 und COX-2, sind bisher in verschiedenen Spezies kloniert und charakterisiert worden (COX-1: Merlie et al., 1988, Yokoyama et al., 1988, DeWitt und Smith, 1988; COX-2: Fletcher et al., 1992; Jones et al., 1993; Feng et al., 1993; Kennedy et al., 1993). Beide Isoformen ähneln sich in Proteinstruktur und Katalysemechanismus, unterscheiden sich aber im Expressionsmuster und der Struktur ihrer Gene.

COX-1 wird als Produkt eines „Haushaltsgens“ in fast allen Geweben konstitutiv exprimiert (Crofford, 1995). Die Transkription des 22 kb großen Gens wird vorwiegend durch den Entwicklungs- und Differenzierungsstatus des jeweiligen Zelltyps kontrolliert. Über den COX-1-Weg synthetisiertes PGE_2 ist u.a. an der Regulation der Nierenaktivität beteiligt und schützt die Magen- und Intestinalmucosa durch Steuerung der Mikrozirkulation bzw. Regulation der Säureproduktion vor Selbstverdauung. COX-2 kontrolliert über die Bildung von TXA_2 und Prostacyclin auch die Thrombozytenaggregation (Patrignani et al., 1994; Smith und Bell, 1978; Schafer, 1995).

Im Gegensatz zu COX-1 wird COX-2 nur in wenigen Geweben wie speziellen Arealen des zentralen Nervensystems (Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Rückenmark), der

Lunge sowie in der Macula densa und der Medulla der Niere konstitutiv exprimiert (Breder et al., 1995; Breder und Saper, 1996; Harris et al., 1994; Guan et al., 1997). Als sogenanntes „inflammatorisches Notfallenzym“ ist COX-2 durch ein breites Spektrum von Stimuli induzierbar. Dazu zählen Hormone (FSH, LH), Wachstumsfaktoren (PDGF, EGF), Cytokine (IL-1, TNF α), Tumorpromotoren (Phorbolester TPA, UVB-Strahlung) und bakterielle Toxine (LPS) (Sirios und Richards, 1992; Kubuju et al., 1991; Jones et al., 1993; Buckman et al., 1998; Reddy und Herschman, 1994). Die COX-2-Transkription wird durch Glucocorticoide (Dexamethason) und anti-inflammatorische Cytokine (IL-4, IL-10) gehemmt (Bakhle und Botting, 1996; Onoe et al., 1996). Mit 8 kb ist das COX-2-Gen deutlich kleiner als das Gen von COX-1. Dies ist charakteristisch für schnell induzierbare Gene (Herschman et al., 1991). Durch COX-2 gebildete Prostanoiden spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungs- und Stressreaktionen aber auch bei Ovulation, Geburtsvorgang, Neurotransmission, Knochenmetabolismus und Nierenfunktion (Yamagata et al., 1993; Masferrer et al., 1994; Seibert et al., 1994; O' Brien, 1995; Pilbeam et al., 1997; Gilroy und Nash, 2000).

Die unterschiedliche Regulation der Expression von COX-1 und COX-2 beruht auf verschiedenen Gen-Promotoren. Der TATA-lose COX-1-Promotor weist mehrere Transkriptionstartpunkte auf. Bisher wurden zwei sowohl cis- als auch trans-regulatorische Sp1-Elemente identifiziert, die entscheidend zur konstitutiven Expression beitragen (Kraemer et al., 1992; Su et al., 1997). Im Gegensatz dazu enthält der 5'-flankierende Bereich des COX-2-Gens neben einer TATA- und E-Box viele regulatorische Elemente, welche eine Induktion durch unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden ermöglichen. Hierbei handelt es sich z.B. um NF- κ B-Bindestellen, ATF/CRE-Sequenzen als Bindestellen für die AP1-Familie sowie C/EBP- und NF/IL6-regulatorische Elemente (Fletcher et al., 1992; Tazawa et al., 1994; Su und Karin, 1996).

Im Gegensatz zur COX-1-mRNA wird die COX-2-mRNA auch posttranskriptionell reguliert, so z.B. durch differentielles Spleißen. Darüber hinaus sind zahlreiche AUUUUA-Motive in der 3'-untranslatierten Region für einen raschen Abbau verantwortlich (Shaw und Kamen, 1986).

Je nach Spezies sind die primären Aminosäuresequenzen von COX-1 und -2 60-65% homolog. In katalytisch aktiver Form liegen beide Isoenzyme als Kopf-Schwanz-Homodimere vor (Picot et al., 1994; Picot und Gravito, 1994). Jedes COX-Monomer gliedert sich strukturell in drei Domänen: eine N-terminale EGF-homologe Domäne, die die Kontaktfläche für die Dimerisierung bildet, eine aus vier Helices bestehende membranbindende Domäne und eine globuläre C-terminale Domäne, welche die beiden Katalysezentren trägt (Picot et al., 1994).

Beide Isoformen weisen als unprozessierte Proteine N-terminale Signalpeptide auf, die ihre subzelluläre Lokalisation als integrale Membranproteine des rauen endoplasmatischen Retikulums und der Kernmembran, nicht aber der Plasmamembran, steuern. Das COX-1-

Signalpeptid setzt sich aus 24-26 Aminosäuren, das COX-2-Signalpeptid aus nur 17 Aminosäuren zusammen (Sirios und Richards, 1992). Darüber hinaus enthält das COX-2-Protein eine 18 Aminosäuren große C-terminale Kasette, die in der COX-1-Sequenz fehlt. Des weiteren unterscheiden sich die COX-Isoenzyme in ihrem Glykosylierungsmuster. Während das COX-1-Protein an drei Asparaginresten (Asn) glykosyliert ist, besitzt COX-2 eine zusätzliche Glykosylierungsstelle am Asn 580 und liegt in 2-4 fach glykosylierter Form in der Zelle vor. Die glykosylierten COX besitzen Molekulargewichte von 71 (COX-1) bzw. 72-74 kD (COX-2). Die Glykosylierung scheint für die enzymatische Aktivität essentiell zu sein (Murates et al., 1988; Otto et al., 1993; Otto und Smith, 1994).

Aus den Kristallstrukturen der Mensch- und Maus-COX-Proteine sind die strukturellen Eigenschaften, welche für die unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorselektivität beider Isoformen verantwortlich sind, abgeleitet worden (Luong et al., 1996; Kurumbail et al., 1996; Picot et al., 1994). Bis auf zwei Isoleucin/Valin-Substitutionen an den Positionen 434 und 523 in der COX-2-Sequenz sind die Aminosäuren der Substratbindungstaschen und der aktiven Zentren identisch. Der Austausch des voluminösen Isoleucins in Position 434 durch das kleinere Valin öffnet im COX-2-Molekül eine zusätzliche Seitentasche im vergrößerten Substratbindungskanal. Deshalb setzt COX-2 neben Arachidonsäure auch andere ungesättigten Fettsäuren wie Eicosapentaensäure, α - und γ -Linolensäure und Linolensäure effizienter um (Otto und Smith, 1995). Außerdem oxidiert die durch Aspirin am Serin 530 acetylierte COX-2 die Oxidation von Arachidonsäure zu 15(R)-HETE, während die acetylierte COX-1 inaktiv ist (Mancini et al., 1994; Lecomte et al., 1994; O'Neil et al., 1994).

Aspirin zählt zu der Arzneimittelgruppe der nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drugs). Während Aspirin und verwandte Acylsalicylate COX durch Acetylierung irreversibel hemmen, blockieren andere NSAIDs die Cyclooxygenaseaktivität durch reversible kompetitive Bindung am aktiven Zentrum. Anhand der Selektivität für eines der beiden COX-Isoenzyme werden sie in unspezifische (Aspirin in hoher Dosierung, Indomethacin), selektive COX-1- (Aspirin in niedriger Dosierung, Acylsalicylate, SC-58560), selektive COX-2- (Meloxicam) und hochselektive COX-2-Inhibitoren (NS 398, Celecoxib, Rofecoxib) eingeteilt (Frölich, 1997). Die hohe Selektivität der zuletzt genannten Inhibitoren beruht auf der 523 Ile/Val-Substitution in COX-2 (Wong et al., 1997a).

Die Langzeiteinnahme COX-1-inhibierender NSAIDs kann Magenblutungen und -geschwüre sowie gravierende Nierenschäden zur Folge haben. Hochselektive COX-2-Inhibitoren zeigen diese Nebenwirkungen nicht. Andererseits weisen COX-1-Knock-out-Mäuse keine intestinalen Ulzerationen oder Dysfunktionen der Nieren auf (Langenbach et al., 1995) und bei COX-2-Knock-out-Tieren wurden keine Veränderung im Ablauf von Entzündungen festgestellt (Morham et al., 1995; Dinchuk et al., 1995).

Diese Beobachtungen deuten auf wechselseitige kompensatorische Funktionen der COX-Isoenzyme hin.

2.3 COX und Krebs

COX-Inhibitoren werden als sogenannte nichtsteroidale Antiphlogistika zur Therapie von Entzündungsreaktionen, Schmerzen und Fieber sowie zur Herzinfarkt-Profilaxe eingesetzt. Seit kurzem werden sie in experimentellen und klinischen Studien auch auf chemopräventive Wirkung gegen Krebs getestet.

In epidemiologischen Studien war unter regelmäßigen Aspirinkonsumenten ein um 40-50% verringertes Darmkrebsrisiko zu verzeichnen (Kune et al., 1988; Rosenberg et al., 1991; Thun et al., 1991). Auch bei Patienten mit der autosomal dominant vererbten Darmkrankheit Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP), die letztlich zu Darmkrebs führt, wurde die chemopräventive Wirkung von NSAIDs nachgewiesen. So inhibiert Sulindac reversibel die Entstehung und das Wachstum von Darmpolypen und fördert deren Regression (Giardiello et al., 1993). Besonderes Interesse gilt in diesem Zusammenhang der COX-2, die sowohl in Darmpolypen als auch in Kolonkarzinomen konstitutiv überexprimiert ist (Kutcher et al., 1996; Eberhart et al., 1994; Kargman et al., 1995). Auch in einem Mausmodell (Tiere mit deletiertem APC-Tumorsuppressorgen) der FAP, ist COX-2 hochreguliert. Bei diesen Mäusen wird die Polypenanzahl durch selektive COX-2-Inhibitoren oder genetischen Knock-out drastisch reduziert (Oshima et al., 1996).

Die COX-2-Überexpression ist nicht auf Tumore des Darms beschränkt, sondern auch für Brust-, Lungen-, Gallen-, Speiseröhren-, Leber-, Hautkrebs u.a. nachgewiesen worden (Ristimäki et al., 1997; Parrett et al. 1998; Wolff et al., 1998; Ratuasinghe et al., 1999; Müller-Decker et al., 1999). In-vivo- und In-vitro-Studien zeigen Zusammenhänge zwischen COX-2-Expression und -Aktivität und Prostaglandin-Akkumulation in Tumorzellen. Es gibt zahlreiche Hinweise, daß Prostanoiden die Zellproliferation stimulieren, Apoptose hemmen, Zell-Zell-Kontakte beeinflussen, immunsuppressiv wirken und die Vaskularisierung des Tumorgewebes durch Angiogenese fördern (Tsujii et al., 1995; Tsujii et al., 1998; Hao et al., 1999; Masferrer et al., 2000; Williams et al., 2000).

In einer ersten klinischen Studie konnte die krebspräventive Wirksamkeit von nebenwirkungsarmen hochselektiven COX-2-Inhibitoren bestätigt werden: FAP-Patienten wiesen nach der Behandlung mit Celecoxib eine um 33% verringerte Tumorbildung auf (Steinbach et al., 2000).

Die Rolle von COX bei der Antitumorwirkung von NSAIDs ist nicht unumstritten (Piazza et al., 1995; Hanif et al., 1996). So besitzt das die COX-Aktivität nicht beeinflussende Su-

lindac-Sulfon protektive Eigenschaften gegen chemisch induzierte Mammarkarzinome (Thompson et al., 1997).

2.4 Die Haut als Modellsystem für die Erforschung normaler und pathologischer COX-2-Funktionen

Die Antitumor-Wirkung eines COX-Inhibitors (Indomethacin) wurde zum ersten Mal bei der chemisch induzierten Tumorgenese in der Maushaut beobachtet (Fürstenberger und Marks, 1987). In der vorliegenden Arbeit wird die Funktion von COX-2 in diesem Gewebe näher untersucht.

Maushaut ist ein besonders geeignetes Modell zur

- a) In-vivo-Analyse biochemischer Prozesse in Epithelien
- b) Erforschung von Zusammenhängen zwischen Stoffwechsel und Krebsentstehung

Bevor auf die mögliche Rolle von Cyclooxygenasen bei der normalen und neoplastischen Entwicklung der Haut eingegangen wird, sollen Aufbau und Morphogenese des Gewebes kurz dargestellt werden.

2.4.1 Übersicht

Die Haut (Cutis) bedeckt als größtes Organ des Körpers seine gesamte Oberfläche. Sie bildet einen Schutzmantel zur Umwelt und spielt eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Körpertemperatur und Wasserhaushalt. Strukturell gliedert sich die Haut in die Epidermis (Oberhaut), die Dermis (Unterhaut) und die Subcutis (Unterhautfettgewebe). Zur Haut gehören auch Haare, Nägel, Talg- und Schweißdrüsen.

Die Dermis wird durch Fibroblasten, endotheliale und neuronale Zelltypen geprägt. Fibroblasten synthetisieren die wichtigsten Komponenten der dermalen extrazellulären Matrix. Diese besteht aus einer amorphen, hyaluronsäurehaltigen Proteoglykan-Grundsubstanz, in die Typ III-Kollagen- und Elastinfasern eingebettet sind (Frances und Roberts, 1984). Monozyten, Makrophagen und Mastzellen übernehmen eine Funktion bei der primären lokalen Immunabwehr. Weitere immunkompetente Zellen können über das gut ausgebildete mikrovaskuläre System in die Dermis einwandern. Das dermale Blutgefäßsystem gewährleistet die Versorgung der gesamten Haut mit Nährstoffen. Diese werden durch Diffusion in die gefäßlose Epidermis transportiert.

Im Unterhautfettgewebe dominieren Aggregate von lipidspeichernden Fettzellen. Diese Adipozyten entwickeln sich aus spindelförmigen mesenchymalen Vorläuferzellen. Unterhalb der Subcutis schließen die glatten Muskelfasern des Panniculus carnosus die Cutis ab. Epidermis und Dermis sind durch die Basalmembran voneinander getrennt, die als epidermale Grenze auch alle Hautanhangsgebilde umgibt (Eady et al., 1988; Moll und Moll, 1998; Jones et al., 1998). Die subepidermale Basalmembranzone bildet die Lamina lucida, deren Bestandteile z.B. die Strukturproteine Laminin 1 und Nidogen sowie neutrale Mukopolysaccharide sind (Stoughton und Wells, 1950). Charakteristisch für die an die Dermis grenzende Lamina densa ist u.a. der hohe Gehalt an Typ IV- und VII-Kollagen (Yansey, 1995).

2.4.2 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis (Abb. 2) ist ein mehrschichtiges Plattenepithel ektodermalen Ursprungs, das zu 90% aus Keratinozyten besteht. Neben Keratinozyten sind in der Epidermis immunkompetente Langerhanszellen, neuroendokrine Merkelzellen und unmyelinisierte Axone sowie Melaningranula produzierenden Melanozyten lokalisiert.

Das Gewebe unterliegt im adulten Stadium einem dynamischen, irreversiblen Verhornungsvorgang (Keratinisierung). Im gleichen Umfang wie Zellen in der untersten Keimschicht nachgebildet werden, schilfern tote Zellen an der Hautoberfläche ab, d.h. es besteht ein Fließgleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zelltod, das eine konstante Dicke der Epidermis garantiert.

Die terminale Differenzierung von Keratinozyten führt in der Epidermis zur Ausbildung von vier Zellschichten (Polakowska und Haake, 1994; Paus et al., 1995): dem Stratum (Str.) basale (Keimschicht), dem Str. spinosum, (Stachelzellschicht), dem Str. granulosum (Körnerschicht) und dem Str. corneum (Hornschicht).

Das Str. basale besteht aus einer Schicht hochprismatischer, undifferenzierter Keratinozyten, die proliferationsaktiv und über Hemidesmosomen in der Basalmembran verankert sind. In der sich anschließenden Stachelzellschicht flachen sich die unregelmäßig polygonalen Zellen parallel zur Hautoberfläche ab. Das Str. granulosum mit seinen flachen rhomboiden Zellen bildet zusammen mit dem Str. corneum die keratogene Zone der Epidermis. Im oberen Str. granulosum beginnt der strukturelle Umbau vom lebenden Keratinozyten zum toten Korneozyten (Elias et al., 1998). Untereinander sind die Keratinozyten durch desmosomale Zell-Zell-Kontakte verknüpft. Diese E-Cadherin (Borradori und Sonnenberg, 1996) enthaltenden Kontakte überbrücken die Interzellularräume, die in der Epidermis

besonders groß und zahlreich sind und den Zellen im Str. spinosum das stachelzellartige Aussehen verleihen.

Das Zytoskelett der Keratinozyten ist bis zu 85% aus Keratin-Intermediärfilamenten aufgebaut. Das exprimierte Keratinmuster ist charakteristisch für den jeweiligen Differenzierungsgrad und erlaubt eine Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen Straten der Epidermis (Steinert et al., 1985, Fuchs, 1993; Eckert et al., 1997). In der Basalzellschicht werden die Tonofibrillen von den Keratinen 5 und 14 gebildet, die in den suprabasalen Schichten vom Keratinpaar K1/K10, sowie regiospezifisch von den Keratinen 2 und 9 abgelöst werden (Fuchs und Green, 1980; Roop et al., 1987; Schweizer, 1993).

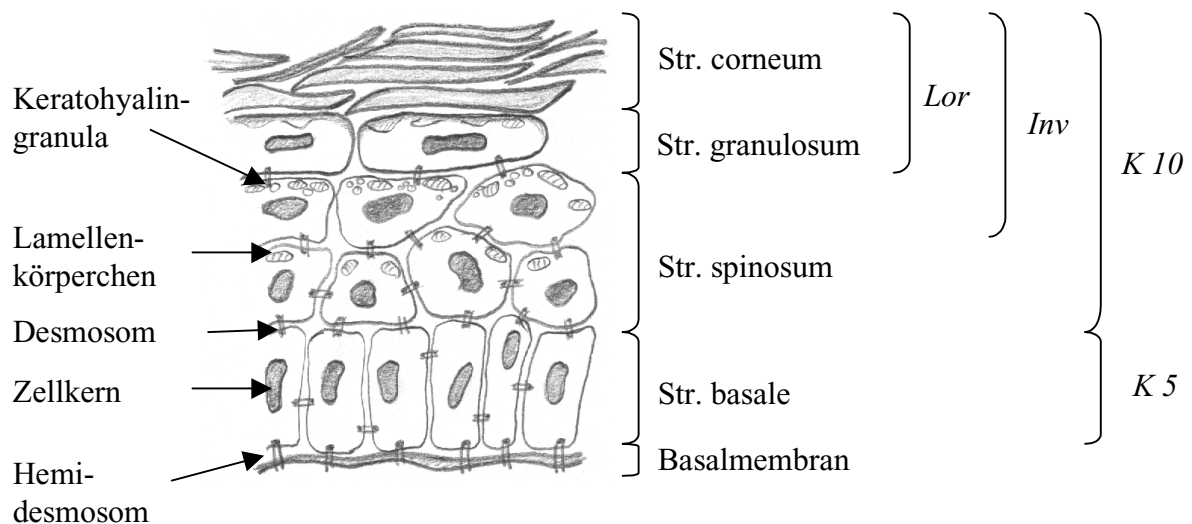


Abb. 2: Schematische Darstellung der Epidermis

Die Epidermis, ein mehrschichtiges verhornendes Plattenepithel bestehend aus dem Str. basale, Str. Spinosum, Str. granulosum und Str. corneum, ist strukturell das Resultat der terminalen Differenzierung der Keratinozyten. Differenzierungsstatus-spezifisch exprimieren die Keratinozyten charakteristische Strukturproteine (K 5, Keratin 5, K10 Keratin 10, Inv Involucrin, Lor Loricrin). Die basalen Keratinozyten sind über Hemi-desmosomen mit der Basalmembran, die die Epidermis von der Dermis trennt, verankert. Die intra-epidermalen Zell-Zell-Kontakte werden über Desmosomen vermittelt.

Im Zytoplasma der Stachelzellen sind eiförmige Granula, sogenannte Lammellenkörperchen, lokalisiert (Odland und Holbrook, 1981; Elias, 1983). Ihre Anzahl nimmt im darüberliegenden Str. granulosum zu. Außerdem weist das Zytoplasma der Körnerzellen eine Vielzahl von Keratohyalingranula auf.

Zwei Typen von Keratohyalingranula sind beschrieben worden: zum einen die großen, phosphorhaltigen und histidinreichen, zum anderen die kleinen, schwefelhaltigen, und

cysteinreichen Granula. Als charakteristischer Marker der späten epidermalen Differenzierung enthalten die schwefelhaltigen Keratohyalin granula das extrem unlösliche Protein Loricrin (Mehrel et al., 1990; Hohl et al., 1993). Eine Hauptkomponente der histidinreichen Keratohyalin granula ist das Profilaggrin, das proteolytisch zu Fillagrin gespalten wird und an der Bündelung der Tonofibrillen zu Makrofibrillen beteiligt ist (Dale et al., 1985). Außerdem katalysieren freigesetzte lysosomale Enzyme die schrittweise Degradation der Zellkerne und der cytoplasmatischen Zellorganellen.

Die Lamellenkörperchen und Keratohyalin granula verschmelzen unter Sekretion der in ihnen enthaltenen unlöslichen Proteine und Lipide mit der Plasmamembran und tragen zur Ausbildung der epidermalen Barriere, der sogenannten "Cornified Cell Envelope"-Struktur im Str. corneum bei (Rice and Green, 1979; Eckert et al., 1993). Diese epidermisspezifische Struktur besteht aus kernlosen Hornzellen mit ihrer Proteinhülle und der kovalent verankerten Lipidhülle, die wiederum von extrazellulären Lipidlamellen eingeschweißt sind (Roop, 1995; Marekov und Steinert, 1998). Diese 10-20 nm dicke Schicht bildet den eigentlichen Schutzmantel der Haut.

2.4.3 Morphogenese der Epidermis

Im Mausembryo entsteht die Epidermis zunächst in Form einer einlagigen mikrovillibesäumten ektodermalen Zellschicht. Zwischen Tag 7 und 12 der Embryonalentwicklung bilden sich die frühen desmosomalen Vorläufer und eine dünne Basalmembran aus. In diesem Stadium werden die für einfache adulte Epithelien charakteristischen Keratine 8 und 18 exprimiert (Jackson et al., 1981; Franke et al., 1981; Schweizer und Winter, 1982). Vom Tag 13 der Embryogenese an wird die basale Keimzellschicht von einem einlagigen Periderm bedeckt.

Ab Tag 13,5 beginnt im Periderm und der darunterliegenden Basalzellschicht die körperspezifische Induktion der basalen Keratine 5 und 14, ab Tag 14,5 wird dieses Keratinpaar gleichmäßig in der gesamten Epidermis des Embryos exprimiert (Byrne et al., 1994). Gesteuert wird diese Keratinexpression durch Signale der Dermis (Sengel et al., 1990). Durch eine gesteigerte Proliferationsaktivität der Basalschicht entsteht zwischen Tag 13 und 17 eine mehrlagige Zwischenschicht, die anschließend zu einem typischen Plattenepithel ausdifferenziert (Kopan und Fuchs, 1989). Parallel dazu wird die Expression der suprabasalen Keratine 1 und 10 angeschaltet (Moll et al., 1982; Schweizer und Winter, 1982; Byrne et al., 1994). Zwischen Tag 18 und 20, d. h. unmittelbar vor der Geburt, wird das Periderm abgestoßen und durch ein gut ausgebildetes Stratum Corneum ersetzt (Weiss

und Zelickson, 1975). In der frühen postnatalen Phase ähnelt die interfollikuläre Epidermis der humanen Epidermis.

Bei der Maus beginnt nun körperregionspezifisch das Ausdünnen der Epidermis. Davon besonders betroffen sind Bauch- und Rückenhaut, in denen durch Zellabbau und Phagozytose die Desorganisation des Str. spinosums und Str. granulosums einsetzt. Im adulten Tier besteht die Epidermis meist nur aus zwei bis drei Zellschichten. In der Haut von Fußsohlen und Schwanz treten solche Veränderungen nicht auf.

Eine Population langsam zyklisierender basaler Keratinozyten, die in der gesamten Epidermis vorkommen, ist für die Gewebsregeneration verantwortlich (Lavker und Sun, 1983; Cotsarelis et al., 1989; Morris und Potten, 1994). Ihren Ursprung haben diese Zellen in den bipotenten Stammzellen des Haarfollikels, die im Wulst-Bereich lokalisiert sind. Je nach Art der mesenchymalen Stimulation werden sie zu basalen Vorläuferzellen oder regenerieren den Haarfollikel (Taylor et al., 2000; Morris und Potten, 1999).

2.4.4 Aufbau des Haarfollikels

Haare zählen neben den Nägeln zu den verhornten Anhangsgebilden der Epidermis. Die haarbildenden Strukturen (Haarfollikel) setzen sich aus dem aus der Hautoberfläche herausragenden Haarschaft, bestehend aus Haarkutikula, Haarrinde und Haarmark und der zum Teil bis in die Subcutis reichenden Haarwurzel zusammen, die sich nach unten zur Haarzwiebel verdickt. Diese ist von einer bindegewebsartigen, kollagenreichen Bindegewebsscheide und der Glashaut, umgeben, die von der Dermis gebildet wird.

Zur Dermis hin wird der Haarfollikel von der äußeren Wurzelscheide abgeschlossen, die einen Ausläufer der Epidermis darstellt. Morphologisch gliedert sich der ausgewachsene Haarfollikel in drei Abschnitte (Abb. 3 A). Der untere Teil reicht von der Haarzwiebel bis zum Ansatzpunkt des Musculus arrector pili, einem glatten Muskelstrang, der das Haar fixiert und ausrichtet. Der untere Abschnitt des Haarfollikels ist aus fünf Zellkompartimenten aufgebaut. An die mesenchymale dermale Papille schließen sich die pluripotenten Zellen der Haarmatrix an, aus denen die 6 Zelltypen der inneren Wurzelscheide und des Haares hervorgehen (Reynolds und Jahoda, 1993). Die Region zwischen dem Ansatzpunkt des Musculus arrector pili und der Einmündung des Talgdrüsenausführganges wird als Isthmus bezeichnet. Während die äußere Wurzelscheide sich in dieser Region zum Wulst verdickt, löst sich die innere Wurzelscheide unter der Bildung einer hyalinen, eosinophilen Matrix auf. Im oberflächennahen Abschnitt des Haarfollikels, dem Infundibulum, geht die nun keratinisierende äußere Wurzelscheide in die Epidermis über. Charakteristisch für diesen Bereich ist die hohe Anzahl dendritischer Langerhanszellen.

Die durch Differenzierung aus den Haarmatrixzellen gebildeten Zellschichten der inneren Wurzelscheide sowie des Haares durchlaufen von außen nach innen einen stufenweisen Keratinisierungsprozess. Unter Bildung des reifen Haares aus den isoprismatischen Zellen des Haarmarks entstehen dabei im Haar luftgefüllte Zwischenräume. Die Haarrinde setzt sich aus 2-3 Lagen isoprismatischer Zellen zusammen, die zu Schichten dicht gepackter spindelförmiger Zellen keratinisieren, während die kubischen Zellen der Haarkutikula dachziegelförmige Schuppen ausbilden.

Die Zellen von Haarmark, –rinde und –kutikula keratinisieren ohne Ausbildung granulärer Strukturen. Dem Verlust der Zellkerne folgt die Auffüllung des Zytoplasmas mit Keratinfibrillen. Dies führt zur Entstehung von „hartem Keratin“, das sich durch seinen hohen Schwefelgehalt auszeichnet (Abb. 3 B).

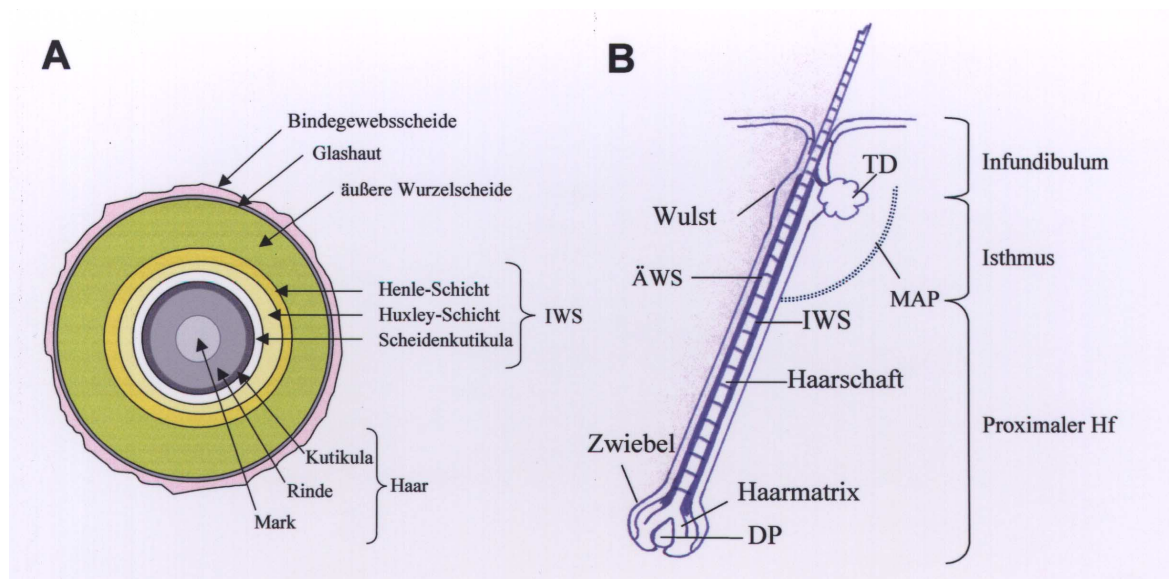


Abb. 3: Morphologie des Haarfollikels

(A) Längsschnitt durch den ausgewachsenen Haarfollikel (B) Querschnitt durch den Haarfollikel im Bereich des Isthmus: von innen nach außen sind die konzentrisch angeordneten Zellschichten des sich entwickelnden Haares, der inneren Wurzelscheide (IWS), sowie die äußere Wurzelscheide (ÄWS), die Glashaut und die Bindegewebsscheide dargestellt.

DP Dermale Papille, MAP Musculus arrector pili, TD, Talgdrüse

Im Gegensatz dazu verhornen die Schichten der inneren Wurzelscheide analog zur Epidermis unter Bildung von Trichohyalin granula zu „weichem Keratin“. Die innere Wurzelscheide ist aus drei konzentrischen Schichten – Scheidenkutikula, Huxley- und Henle-Schicht – aufgebaut (Abb. 3 B). Die Hornschuppen der Scheidenkutikula verzahnen mit

den Haarkutikulaschuppen und verankern so das Haar im Follikel. Die sich anschließende trichohyalingranulare Huxley-Schicht setzt sich aus zwei bis drei Zellagen zusammen. Den äußeren Ring der inneren Wurzelscheide bildet die Henle-Schicht, die an die äußere Wurzelscheide grenzt.

Die äußere Wurzelscheide ist ein mehrschichtiges Epithel, das sich bis an das Ende der Haarzwiebel ausdehnt und im Infundibulum in die Epidermis mündet. Als Verlängerung der epidermalen Basal- und Stachelzellschicht verhornt die äußere Wurzelscheide nur im Bereich der Talgdrüse. Im Gegensatz zu den Keratinozyten der interfollikulären Epidermis weisen die Zellen der äußeren Wurzelscheide in ihrem Zytoplasma Glykogengranula und vaskuläre Einschlüsse auf.

2.4.5 Morphogenese des Haarfollikels

Die Haarfollikelmorphogenese verläuft in 8 Stadien ab (Abb. 4), die durch die Länge und Position des Haarfollikels in der Haut sowie durch die Expression spezifischer Markerproteine charakterisiert sind (Hardy, 1992; Paus, 1998). Bei der Maus beginnt sie am Tag 14,5 der Embryonalentwicklung parallel zur Stratifizierung der Epidermis. In diesem Stadium 0 entscheiden Wechselwirkungen zwischen entstehender Epidermis und den angrenzenden mesenchymalen Fibroblasten der Dermis darüber, ob sich die basalen Keratinozyten zum Haarfollikel oder zur interfollikulären Epidermis entwickeln.

Entsteht ein Haarfollikel, so wird zunächst eine Plakode gebildet, die den Ursprungsort des Haarkeimes definiert (Stadium 1). An dieser Stelle kommt es zu einer Verdickung der Epidermis, die dermal von einer Akkumulation mesenchymaler Fibroblasten begleitet wird. Im Stadium 2 entsteht durch Invagination der epidermalen Basalzellen in die Dermis der Haarkeim. Die am unteren Ende des Haarkeims formierten Fibroblasten kondensieren im Stadium 3 zur dermalen Papille. Diese wird in den darauffolgenden Stadien vom auswachsenden Haarzapfen konkav umschlossen und die Haarzwiebel bildet sich aus. Die Keratinozyten des auswachsenden Haarzapfens ordnen sich säulenartig um die longitudinale Achse des entstehenden Follikels an und begünstigen so die radiale Anordnung der verschiedenen Zellschichten. Im Stadium 4 differenzieren die oberhalb der dermalen Papille lokalisierten, hochproliferativen Keratinozyten zu Haarmatrixzellen und induzieren so die Bildung der inneren Wurzelscheide, die von der äußeren Wurzelscheide umschlossen wird, sowie der Haarzellen. Charakteristisch für das Stadium 5 ist das Auftreten der ersten zwei Sebozyten im oberen Teil des Haarfollikels, die sich im Laufe der Morphogenese zur lateral gelegenen Talgdrüse differenzieren. Außerdem wird die Wulst-Region, der Ansatzpunkt des Musculus arrector pili, ausgebildet. Im Stadium 6 ist die innere Wurzelscheide

voll entwickelt und umschließt den wachsenden Haarschaft, der die Wulst-Region erreicht hat. Gleichzeitig beginnt sich am oberen Ende des Follikels der Haarkanal zu öffnen. Daraufhin folgt der Eintritt des Haarschafts aus der inneren Wurzelscheide in den Haarkanal (Stadium 7).

Im Stadium 8 ist der Haarfollikel zu voller Länge ausgebildet und entspricht morphologisch einem reifen, anagenen Haarfollikel. Während das proximale Ende bis an den Panniculus carnosus reicht, erscheint die Haarspitze oberhalb der Epidermis.

Am Tag 16 postnatal ist die Morphogenese des Haarfollikels abgeschlossen. Danach unterliegt er einer ständigen, durch Wachstumsfaktoren, Cytokine und Hormone gesteuerten zyklischen Transformation, genannt Haarzyklus, unterteilt in eine katagene, anagene und telogene Phase (Dry, 1926; Paus et al., 1999a). In der Maushaut laufen sowohl die Haarfollikelmorphogenese, als auch der erste Haarzyklus nach einem präzise synchronisierten Schema ab (Chase, 1954).

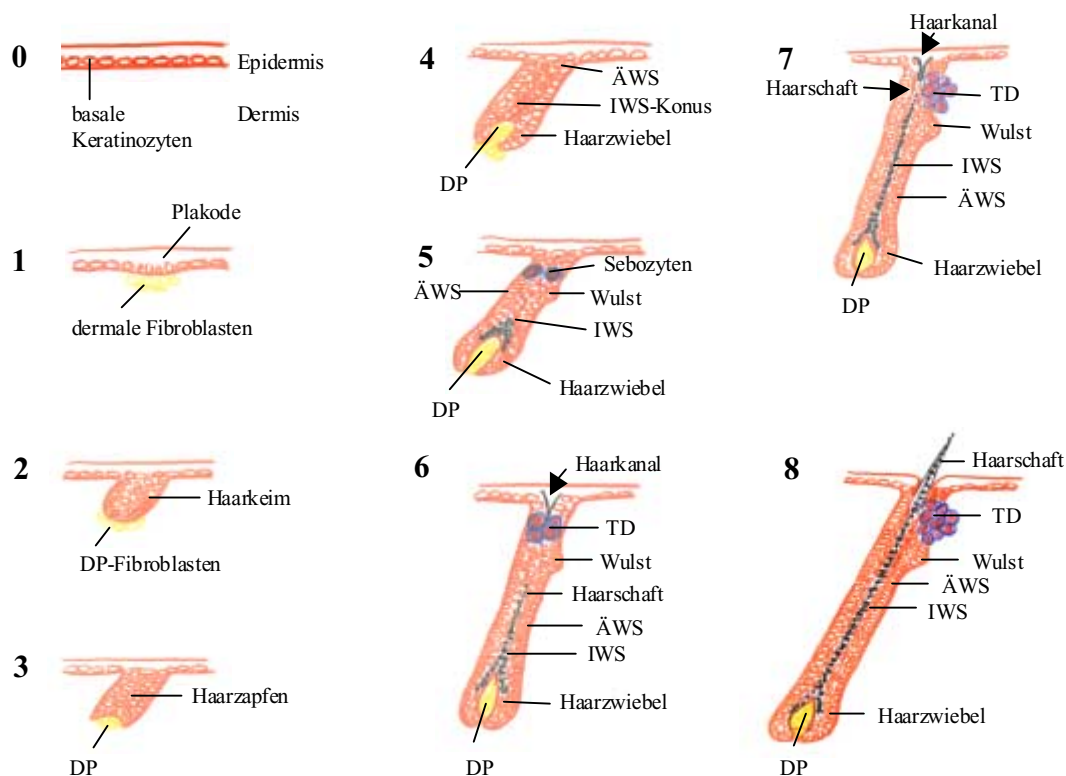


Abb. 4: Stadien der Haarfollikelmorphogenese

Schematische Darstellung nach Hardy (1992)

DP dermale Papille, ÄWS äußere Wurzelscheide, IWS innere Wurzelscheide, TD Talgdrüse

2.4.6 Der Haarzyklus

Bei der Maus durchläuft der voll ausgebildete Follikel zwischen Tag 17 und 19 nach der Geburt eine regressive Phase, das Katagen (Straile et al., 1961). Dabei verliert er seine charakteristische Morphologie und verkürzt sich um zwei Drittel seiner ursprünglichen Länge. Vor allem der epitheliale mittlere Abschnitt und die Haarzwiebel sowie die Komponenten der extrazellulären Matrix unterliegen einem intensiven Um- und Abbau, die durch programmierten Zelltod und terminale Differenzierung gekennzeichnet sind (Weedon und Strutton, 1981; Paus, 1996; Lindner et al., 1997). Lediglich das Infundibulum bleibt strukturell erhalten.

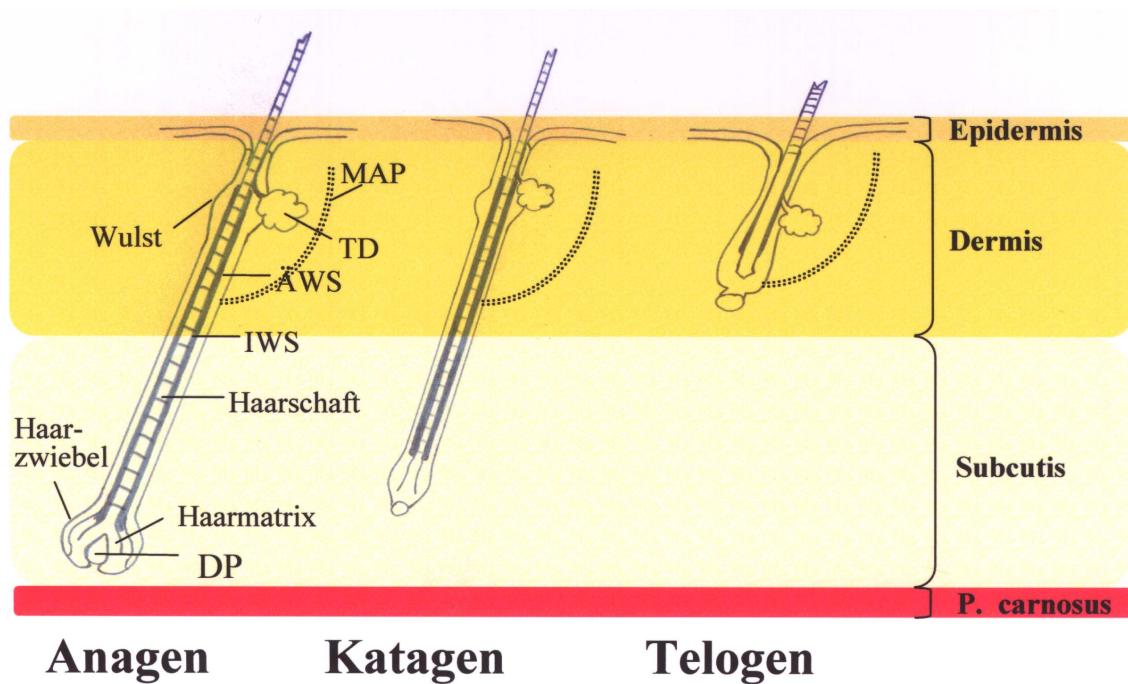


Abb. 5: Haarzyklus der Maus (nach Paus, 1999)

ÄWS äußere Wurzelscheide, IWS innere Wurzelscheide, TD Talgdrüse, DP dermale Papille, MAP Musculus arrector pili, P. carnosus Panniculus carnosus

Eingeleitet wird das Katagen durch die Einstellung der mitotischen Aktivität der Haarmatrixzellen. Danach werden die Strukturen der Haarzwiebel und des Isthmus fast vollständig aufgelöst. Der untere Follikelabschnitt degeneriert zu einem Band epithelialer Zellen an dessen Ende die nun nicht mehr von der Haarzwiebel umschlossene dermale Papille ballförmig kondensiert. Das epitheliale Band zieht sich schrittweise zur Hautoberfläche hin

zurück. Parallel hierzu wandern sowohl Haarschaft als auch die dermale Papille in Richtung Haarfollikelwulst. Final positioniert sich die dermale Papille unterhalb der Talgdrüse im Bereich der Dermis. Die innere Wurzelscheide bildet sich währenddessen fast vollständig zurück, und das Haar wird komplett von der keratinisierenden äußeren Wurzelscheide umschlossen.

Während des gesamten Regressionsvorgangs bleibt der Haarfollikel von der sich zusammenfaltenden dermalen Bindegewebsscheide sackartig umgeben. Diese bildet auch später wieder die Hülle für den auswachsenden neuen Haarfollikel.

In der sich von Tag 19 bis 22 anschließenden Ruhephase, dem Telogen, ist der Haarfollikel morphologisch stabil und weist nur wenig mitotische Aktivität auf. Der Übergang in eine erneute Wachstumsphase, das Anagen, wird durch eine Aktivierung der in der Wulstregion lokalisierten Stammzellen eingeleitet (Chase et al., 1951; Paus, 1996). Die Signale für die drastisch gesteigerte Proliferationsaktivität gehen von der dermalen Papille aus und induzieren die Bildung eines sekundären Haarkeimes, aus dem sich analog zur Haarfollikelmorphogenese die epithelialen Komponenten des Haarfollikels regenerieren. Während des Aufbaus des neuen Haarschafts wird das alte Haar abgestoßen und fällt aus.

2.4.7 Talgdrüsen

Die zu den epidermalen Anhangsorganen zählenden Talgdrüsen sind einfach verzweigt und aus zwei oder mehreren Alveolen aufgebaut, die in einen gemeinsamen Ausführungsgang enden. Als Teil des Haar-Drüsen-Komplexes mündet der aus einem stratifizierenden Plattenepithel gebildete Talgdrüsenausführungsgang in den oberen Teil des Haarfollikels (Stüttgen und Schaefer, 1974). Von dort aus erreicht der Talg (Sebum) die Hautoberfläche. Die Talgdrüsen werden im Embryo parallel zur Haarfollikelmorphogenese angelegt: im Stadium 6 bilden sich die ersten Sebozyten aus, die sich zur späteren Talgdrüse formieren (Hardy, 1992; Paus et al., 1999).

Jeder Talgdrüsenalveolus ist peripher von abgeflachten, lipidfreien Basalzellen umgeben, die das Talgdrüsenepithel bilden und die Keratine 14 und 5 exprimieren. Die mitotische Aktivität dieser Keimschicht korreliert mit der Sebumproduktion der holokrinen Drüse. Auf dem Weg ins Innere der Alveolen nehmen der Lipidgehalt und das Zellvolumen der Sebozyten stetig zu. Parallel dazu setzt die Degradation des Zellkerns ein. Im Bereich des Talgdrüsenausführungsgangs kommt es zur Desintegration der Zellen durch Autolyse, und das am glatten endoplasmatischen Retikulum produzierte Sebum entleert sich in den Talgkanal. Der Talg ist eine amorphe, fettige Substanz, die zum größten Teil aus Triglyzeriden,

hochmolekularen Wachsen, Squalenderivaten und kleineren Mengen von Phospholipiden besteht (Suskind, 1951).

2.4.8 Das Mehrstufenmodell der Hautkarzinogenese

Die Krebsentwicklung von normalem Gewebe zum metastasierenden Karzinom ist ein langwieriger Prozess, der stufenweise abläuft und bei dessen Etablierung gentoxische und nicht-gentoxische Faktoren zusammenwirken. Als eines der am besten charakterisierten Modelle für epitheliale Krebsentstehung ist die Maushaut besonders geeignet, Zusammenhänge zwischen biochemischen Prozessen und Tumorgenese zu erforschen.

In diesem Modell wird die Karzinogenese in drei Teilschnitte – Initiation, Promotion und maligne Progression – aufgefächert (Abb.6) (Marks und Fürstenberger, 1987).

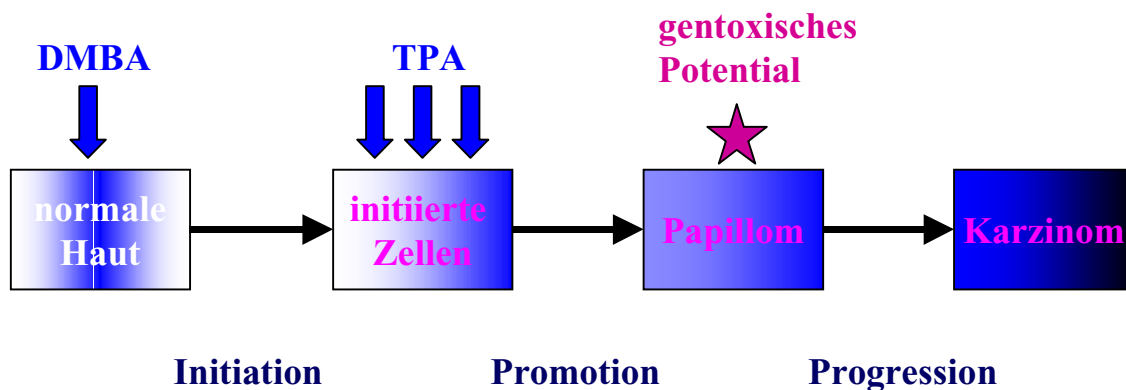


Abb. 6: Experimentelle Mehrstufenkarzinogenese in der Maushaut

Bei der Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut werden die drei Phasen, Initiation, Promotion und maligne Progression unterschieden. Durch die Exposition der Haut mit Karzinogenen wie DMBA werden in der Epidermis initiierte Keratinozyten erzeugt, die irreversible genetische Veränderungen tragen. Durch mehrmalige topische Applikation des Phorbolesters TPA wird ein langanhaltender promovierender Reiz erzeugt, der durch Störung der epidermalen Homöostase die klonale Expansion initiiertter Zellen zu Papillomen ermöglicht, von denen einige sich spontan zu Karzinomen entwickeln. Man vermutet, daß die für die maligne Progression erforderlichen genetischen Veränderungen durch eine gestörte Genreparatur und gentoxische Metabolite (sog. gentoxisches Potential) gefördert werden.

In der ersten Phase, der Initiation, kommt es durch die einmalige Behandlung der Haut mit einem gentoxischen (mutagenen) Karzinogen wie z.B. DMBA (Dimethylbenz(a)anthrazen) zu einer irreversiblen genetischen Veränderung in einigen Keratinozyten, die dann als initi-

ierte Zellen bezeichnet werden (Scribner und Süss, 1987). Dabei handelt es sich um aktivierende Punktmutationen im Ha-ras-Gen (Balmain et al., 1988).

Um initiierte Zellen zur klonalen Expansion anzuregen, bedarf es eines promovierenden Reizes, der durch Induktion einer langanhaltenden Störung der epidermalen Homöostase und Ausbildung einer epidermalen Hyperplasie den initiierten Zellen einen Proliferationsvorteil verschafft. Man vermutet, daß initiierte Zellen unter diesen Bedingungen sensibler auf mitogene und weniger sensitiv auf Signale, die Apoptose bzw. terminale Differenzierung auslösen, reagieren als normale epidermale Zellen. Im Modell der Mehrstufenkarzinogenese werden solche Bedingungen durch die wiederholte Applikation eines Tumorpromotors wie z.B. dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (TPA) oder durch Verwundung erzielt. Bei der Promotion entstehen prä-maligne Läsionen, sogenannte Papillome. Bis zu 80% der Papillome sind reversibel wachsende Tumore, etwa 20% autonom wachsende Tumore, von denen sich etwa 50% zu Karzinomen entwickeln (Fürstenberger und Kopp-Schneider, 1995).

Die maligne Progression vom Papillom zum Karzinom erfolgt spontan und erfordert die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen wie z.B. Trisomien von Chromosom 7, das die Ras-Mutation trägt und Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53. Gefördert werden diese genetischen Veränderungen durch eine genetische Instabilität der Papillomzellen, bedingt durch die Bildung von genotoxischen Metaboliten und Beeinträchtigungen des DNA-Reparatursystems. Es gibt zahlreiche Hinweise, daß der Lipooxygenase- und Cyclooxygenase-katalysierte Arachidonsäurestoffwechsel eine Quelle für beides, tumorpromovierende Wirkstoffe und genotoxische Metabolite, darstellt (Burns et al., 1991; Ruggeri et al., 1991; Brown et al., 1995).

2.4.9 Cyclooxygenasen in normaler und neoplastischer Haut

COX-1 ist in normaler Epidermis konstitutiv in Keratinozyten aller Straten exprimiert und findet sich darüber hinaus in Langerhanszellen und Endothelzellen der dermalen Blutgefäße. Das Enzym ist für die Synthese von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in normaler Epidermis verantwortlich (Fürstenberger und Marks, 1980; Hammerström, 1982; Pentland und Needleman, 1986; Müller-Decker et al., 1998b). COX-2 ist in der interfollikulären Epidermis nicht nachweisbar, zeigt aber eine transiente, haarzyklusabhängige Expression in den Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide des wachsenden anagenen Haarfollikels und des korrespondierenden Talgdrüsenepithels (C. Leder, Diplomarbeit, 1998). Während der katagenen Phase nimmt die COX-2-Expression stetig ab und im telogenen Haarfollikel ist wie in der interfollikulären Epidermis kein COX-2-Protein mehr nachweisbar.

Eine besondere Rolle scheinen Prostaglandine nach Reizung oder Schädigung der Haut zu spielen (Scholz et al., 1995; Müller-Decker et al., 1995). Die Antwort des Gewebes besteht in der Auslösung einer Entzündungsreaktion und einer überschießenden epidermalen Hyperproliferation (epidermale Hyperplasie). Modellhaft kann diese Reaktion durch topische Behandlung mit dem Phorbolster TPA hervorgerufen werden (Fürstenberger und Marks, 1980). Bereits wenige Minuten nach TPA-Einwirkung wird in der Haut verstärkt Arachidonsäure freigesetzt. Dies ist mit einer erhöhten PGE_2 -Synthese gekoppelt, die zunächst durch COX-1 katalysiert wird.

Hemmung der Prostaglandin-Synthese, z.B. durch Indomethacin, hemmt die epidermale Proliferation in Maushaut *in vivo* und deutet auf eine Funktion von PGE_2 bei der Auslösung der hyperplastischen Reaktion. In der Tat kann die durch Indomethacin ausgelöste Proliferationshemmung durch PGE_2 revertiert werden, topisch aufgetragenes PGE_2 wirkt aber für sich allein nicht mitogen. Darüber hinaus induziert der Phorbolster die transiente Expression von COX-2 in basalen Keratinozyten. Sie ist für eine verzögerte PGE_2 - und $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthesewelle nach 3-4 h verantwortlich, die selektiv durch COX-2-Inhibitoren unterdrückt wird (Fürstenberger und Müller-Decker, 1990). Somit ist die Aktivierung beider COX-Isoenzyme für die Induktion einer epidermalen Hyperplasie essentiell.

Bei der Tumorentwicklung im Maushautmodell sind die Akkumulation von Prostaglandinen und die damit verbundene konstitutive Überexpression von COX-2 charakteristische frühe Veränderungen in Papillomen und Plattenepithelkarzinomen. Die COX-1-Expression bleibt dagegen während der Tumorentwicklung unverändert (Müller-Decker et al., 1995). Im Tumorgewebe exprimieren hauptsächlich basale und follikuläre Keratinozyten COX-2; aber auch dendritische Langerhanszellen sowie Zellen von inflammatorischen Infiltraten sind COX-2 positiv. Dabei korreliert die COX-2-Expression in individuellen Keratinozyten mit Geweb dysplasien wie z.B. Verlust der Zellpolarität. Auch bei der UV-ausgelösten Hautkarzinogenese des Menschen tritt die aberrante COX-2-Expression schon in präkanzerösen aktinischen Keratosen auf und bleibt bei fortschreitender Malignität erhalten.

Pharmakologische und genetische Inaktivierung *in vivo* und *in vitro* unterstreichen die wichtige Rolle von COX, insbesondere COX-2 bei der Hautkarzinogenese. COX-1-Knock-out-Mäuse zeigen eine leicht, COX-2-Knock-out-Mäuse eine um 75% verminderte Hauttumorbildung (Langenbach et al., 1999). Im Initiations-Promotions-Modell unterdrücken sowohl der unspezifische COX-Hemmstoff Indomethacin als auch das COX-2-selektive SC-58125 die Tumorpromotion dosisabhängig. Für Indomethacin wurde gezeigt, daß eine simultane Applikation von $\text{PGF}_{2\alpha}$, nicht aber von PGE_2 , den Anti-Tumor Effekt kompensiert. In der mit dem Tumorpromotor TPA behandelten Maushaut korreliert die Kinetik der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese mit dem Auftreten von COX-2 (Fürstenberger et al., 1989; Müller-Decker et al., 1995; Müller-Decker et al., 1998a). Auch bei der UV-induzierten Hautkarzinogenese wirken Indomethacin und der COX-2-spezifische Inhibitor Celecoxib chemopräventiv (Fischer et al., 1999).

Diese Daten weisen COX-2 als ein Protein mit zentraler Bedeutung bei transienten und permanenten Proliferationsstörungen in der Epidermis und als potentielles Ziel für therapeutische und präventive Maßnahmen aus. Für weitere Fortschritte auf diesem Gebiet ist eine detaillierte Analyse der normalen und pathogenen COX-2-Funktionen in der Haut unerlässlich.

2.5 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen die Folgen einer Überexpression von COX-2 in der Mauhaut in vivo analysiert werden. Zu diesem Zweck werden transgene Mauslinien generiert, bei denen die COX-2-cDNA unter der Kontrolle des bovinen Keratin 5-Promotors steht. Aufgrund des epidermalen Differenzierungsmusters wird erwartet, daß diese Tiere COX-2 konstitutiv im basalen Kompartiment der Epidermis exprimieren (Casatorres et al., 1994). Dazu zählen die Keratinozyten des Str. basale der interfollikulären Epidermis und der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels sowie die Zellen des Talgdrüsenepithels (Abb. 7). An diesem Tiermodell sollen die Auswirkungen von COX-2 auf die Epidermisentwicklung und -differenzierung, das Haarwachstum, den Verlauf von Entzündungsreaktionen sowie die Tumorentwicklung untersucht werden.

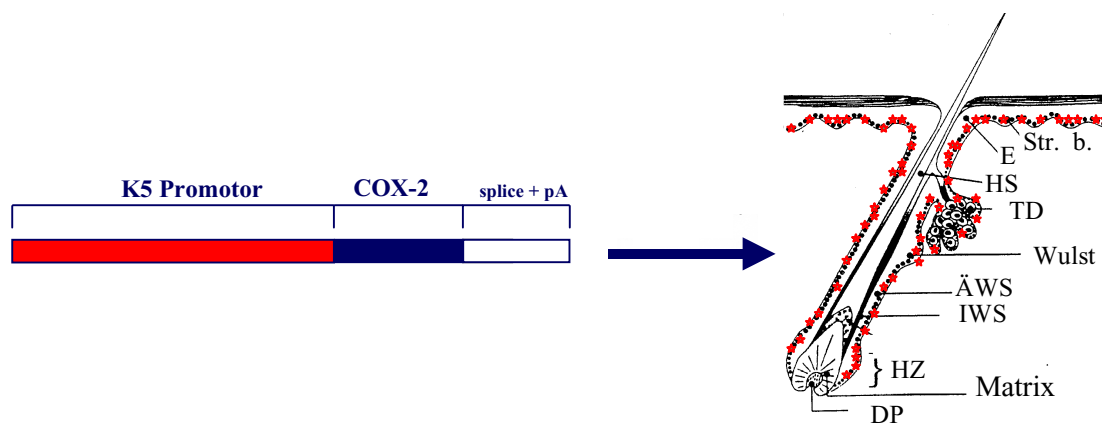


Abb.7: Erwartete COX-2-Expression in der Epidermis von Mäusen mit einem durch Keratin 5-Promotor gesteuerten COX-2-Transgen

Str. b. Stratum basale, E Epidermis, HS Haarschaft, TD Talgdrüse, ÄWS äußere Wurzelscheide, IWS innere Wurzelscheide, HZ Haarzwiebel, DP Dermale Papille
(modifiziert nach Gat et al., 1999)

3 Material

3.1 Geräte

Adsorbex SPU Probenaufreinigungsstation
Axioskop 2
Bakterien-Inkubator
Bakterien-Schüttler
Dismembrator II
Elektrophoresekammer Twin
Elisa-Reader EL 312
Feinwaage 2004 MP
Gene Quant RNA/DNA Calculator
Heizbad
Heizblock 5320
Horizontal-Elektrophoresekammern
Horizontalschüttler Variospeed
Kippschüttler Rockland
Kühltisch Julabo SC
Kühlzentrifuge J2-21
Kryotom CM 3050
Labofuge GL
Laborwasserbad
Magnetrührer
Mikrotom
Mikrowellengerät
Netzgerät PHERO-stab. 500
pH-Meter 646, digital
Röntgenfilm-Entwicklermaschine Curix 60
Röntgenfilmkassetten

Sebumeter SM 810
Speedvac Vakuumkonzentrator
Sequenzierungsgerät ABI Prism 310
Szintillationszähler LS 5000 TD
Thermocycler
Tischzentrifuge 5412
Transfer Blotkammer SD1
Überkopfschüttler
UV-Stratalinker 1800

Merck, Darmstadt
Zeiss, Göttingen
Infors, Bottingen, Schweiz
Infors, Bottingen, Schweiz
B. Braun, Melsungen
Renner, Danntadt
Biotec Instr., Winooski, USA
Sartorius, Göttingen
Pharmacia LKB, Freiburg
GFL, Hannover-Vinnhorst
Eppendorf, Hamburg
Biorad, München
Renner, Dannstadt
Biometra, Göttingen
Julabo, Seelbach, Schweiz
Beckmann, Palo Alto, CA, USA
Leica, Bensheim
Heraeus, Hanau
B. Braun, Melsungen
Heidolph, Kehlheim
Leica, Bensheim
Bosch, Karlsruhe
Biotec-Fischer, Reiskirchen
Methrom, Herisau, Schweiz
Agfa-Gevaert, Leverkusen
Kodak, Rochester, N.Y., USA
Dr. Goos-Suprema, Heidelberg
Kahazak, Köln
Bachofer, Reutlingen
Perkin Elmer, Weiterstadt
Beckmann, München
Biozym, Hess. Oldendorf
Eppendorf, Hamburg
CTI, Idstein
Heidolph, Kehlheim
Stratagene, Heidelberg

Vortex Genie 2
Wasserbadschüttler 3020

Bender & Hobein, Bruchsal
GFL, Hannover

3.2 Laborchemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (Qualex Gold)	AGS, Heidelberg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma, Steinhausen
Aprotinin	Roche Diagnostics, Mannheim
Arachidonsäure	Reatec, Weiterstadt
Bovines Serum Albumin (BSA) Fraktion V	Sigma, Steinhausen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Steinhausen
Elisa-BSA	Sigma, Steinhausen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinhausen
Ethylacetat	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylenglycol-bis-(β -aminoethyl)- N, N, N', N'-tetraacetat (EGTA)	Merck, Darmstadt
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isopentan	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Roche Diagnostics, Mannheim
α_2 -Makroglobulin	Roche Diagnostics, Mannheim
β -Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
3-N-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Steinhausen
Natriumformiat	Merck, Darmstadt
Norleucin	Sigma, Steinhausen
n-Hexan	Merck, Darmstadt
NP 40	Roche Diagnostics, Mannheim
N'-N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Steinhausen

Phenyl-methyl-sulfonamid (PMSF)	Sigma, Steinhausen
Ponceau S	Merck, Darmstadt
Protein G-Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Pharmacia, Freiburg
SC-58635 (Inh 1)	Pharmacia/Searle, USA
SC-65872 (Inh 2)	Pharmacia/Searle, USA
TPA	Dr. Serg, DKFZ
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, Steinhausen
Triton X-100	Roche, Mannheim
Tween 20	Serva, Heidelberg
Wasser, Ultrasolv HPLC-Grade	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in *per analysis* Qualität verwendet. Salze, Säuren und Laugen wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Darmstadt, Sigma, München oder Fluka, Neu-Ulm bezogen.

3.3 Radiochemikalien

[α - ^{32}P]-dCTP	Amersham Buchler,
Radioaktive Konzentration: 370 MBq/ml (10mCi/ml)	Braunschweig
Spezifische Aktivität: 110 TBq/mmol (3000 Ci/mmol)	

3.4 Membranen und Filme

Biodyne B Transfer Membran	PALL, Portsmouth, England
Hybond N+ Membran	Amersham, Braunschweig
Immobilon PVDF-Membran	Millipore, Eschborn
Whatman 3 MM Filterpapier	Bender & Hobein, Bruchsal
Fuji medical X-Ray Röntgenfilme	Diaprint, Heidelberg
Kodak Ektapress Gold II PJC 135-60	Diaprint, Heidelberg
Kodak Gold 400	Diaprint, Heidelberg
Polaroid 667 (s/w)	Diaprint, Heidelberg

3.5 Bakterien, Tiere, Zelllinien

3.5.1 Kompetente Bakterien

One shot (E.coli)	Invitrogene, Leek, Niederlande
Sure 2-Bakterien	Stratagene, Heidelberg
XL1-Blue (E. coli)	Stratagene, Heidelberg

3.5.2 Mäuse-Stämme

B6D2F1-Mäuse	RCC, Füllinsdorf, Schweiz
DBA/2-Mäuse	RCC, Füllinsdorf, Schweiz
NMRI-Mäuse	RCC, Füllinsdorf, Schweiz

3.5.3 Zelllinien

BMGE ⁺ (Bovine Mammary Gland Epithelial Cells)	Schmid et al., 1983
	Prof. W. Franke, DKFZ
COS7	

3.6 Chemikalien und Materialien für die Immunhistochemie

Deckgläser (0,08-0,12 mm; 24 x 70 mm)	R. Langenbrink, Emmendingen
Einbetttschälchen Cryomol Standard	Vogel, Gießen
Eosinrot G	Merck, Darmstadt
Eukitt	O. Kindler GmbH, Freiburg
Fluoreszenz-Mounting-Medium	Dako, Hamburg
Glycergel	Dako, Hamburg
Mayer's Hämalalaun	Merck, Darmstadt
Objektträger SuperFrost	Migge, Heidelberg
Oil Red O	Sigma, Steinhausen
Pap Pen	Vogel, Gießen
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS	Biochrom KG, Berlin
Sigma Fast DAB Tabletten	Sigma, Steinhausen
Tissue Tek	Vogel, Gießen

3.7 Antikörper

3.7.1 Primäre Antikörper

Ziege IgG-anti-Mensch- <i>COX-2</i> -Peptid SC 1745; polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Ziege IgG-anti-Mensch- <i>COX-1</i> -Peptid SC 1754; polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, USA
Kaninchen IgG-anti-Maus- <i>COX-2</i> Hase 82, Immuns serum nach 2. Boost; polyklonal	eigene Herstellung
Kaninchen Serum anti-Maus- <i>COX-1</i> , Hase 50, Immuns serum nach 2. Boost; polyklonal	eigene Herstellung
Kaninchen anti-Maus- <i>Involucrin</i> , Serum polyklonal	F. Watt, Imp. Canc. Res. Inst., London
Kaninchen IgG anti-Maus- <i>Ki67</i> polyklonal	Dianova, Hamburg
Meerschweinchen IgG anti-Maus- <i>Keratin 5</i> polyklonal	L. Langbein, DKFZ
Kaninchen IgG-anti-Maus- <i>Keratin 10</i> polyklonal	Babco, Richmond, CA, USA
Kaninchen IgG-anti-Maus- <i>Loricrin</i> polyklonal	Babco, Richmond, CA, USA
Ratte IgG anti-Maus- <i>PECAM-1</i> (CD 31) Polyklonal	BD, Heidelberg

3.7.2 Sekundäre Antikörper

Esel anti-Ziege-IgG, USA Alkalische Phosphatase gekoppelt	Santa Cruz Biotechnology,
Ratte anti-Maus-IgG ₁ USA Peroxidase gekoppelt	PharMingen Int., San Diego,
Ziege anti-Kaninchen-IgG, Alkalische Phosphatase gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen-IgG Peroxidase gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Kaninchen-IgG Cy3 gekoppelt	Dianova, Hamburg
Ziege anti-Meerschweinchen-IgG Alexa-Fluor 488	MoBiTec, Göttingen

3.8 Proteinanalytik

High Molecular Weight Marker, SDS 6H	Sigma, Steinhausen
Quick Lowry-Kit	Biorad, München
Ultra Low Molecular Weight Marker	Sigma, Steinhausen
Western-Light Chemiluminescent Detektion System	Tropix, Bedford, MA, USA

3.9 Lipidanalytik

Hecht Assistent Reagenzgläser, (88 x 14) x 15 mm Ø	Neolab-Migge, Heidelberg
Silica-C ₁₈ -Glaskartuschen 6 ml (500 mg Isolute C ₁₈)	ICT, Bad Homburg
PGE ₂ Enzyme Immunoassay Kit	Cayman Chemicals, USA
PGE ₂ Affinitäts-Säulen	Cayman Chemicals, USA
PGF _{2α} Enzyme Immunoassay Kit	Cayman Chemicals, USA
6-Keto-PGF _{1α} Enzyme Immunoassay Kit	Assay Designs, Inc., USA

3.10 Molekularbiologische Reagenzien und Kits

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Stratagene, Heidelberg
DNase, RNase frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Nukleosidtriphosphate	Roche Diagnostics, Mannheim
Proteinase K	Stratagene, Heidelberg
PWO-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
Red-Taq-Polymerase	Sigma, Steinhausen
Restriktionsendonukleasen	AGS, Heidelberg
	Roche Diagnostics, Mannheim
	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
RNA-Clean	AGS, Heidelberg
Taq DNA-Polymerase	Appligene-Oncor, Weinheim
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Nick Columns	Amersham Pharmacia LKB, Freiburg
Oligolabeling Kit	AGS, Heidelberg
High Pure PCR-Product-Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAprep Spin Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

RT-PCR-Core Kit	Perkin Elmer, Darmstadt
TA-Cloning Kit	Invitrogene, Leek, Niederlande
Sequenzierung Kit mit Fluoreszenz-markierten ddNTPs	ABI Prism, Darmstadt
DNA-Größenstandard pUC 19 DNA/MspI	MBI Fermentas, St. Leon Roth
DNA-Größenstandard 1 kb-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Roth

3.11 Plasmide und cDNAs

pcDNA3	Plasmid 32	Invitrogen, Leek, Niederlande
pcDNA3- β -Gal	Plasmid 40	Invitrogen, Leek, Niederlande
pAdV Antage	Plasmid 50	Promega, Madison, USA
pCRII		Invitrogen, Leek, Niederlande
Rinder-Cytokeratin 5-Promotor	Plasmid 81	M. Blessing, Mainz
Maus COX-2-cDNA	Plasmid 1132	D. L. Dewitt, East Lansing, USA
Maus COX-1-cDNA	Plasmid 1131	D. L. Dewitt, East Lansing, USA

3.12 Synthetische Oligonukleotide

3.12.1 Oligonukleotide für die Überprüfung der genomischen Integration

181	5'	CCT	AGA	TAA	CAG	AGC	CGC	TTT	C	3'	bK5 5'-UTR fw
182	5'	GCT	AGA	AAC	AGT	GGG	ACT	CTG	A	3'	bK5 3'-UTR rv

3.12.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung, PCR und RT-PCR

Maus COX-2-cDNA

601	5'	CTT	CCG	AGC	TGT	GCT	GCT	CTG	C	3'	N6-27
602	5'	CCC	ACA	CTT	CCC	TTT	ATT	CCT	C	3'	N467-446
603	5'	CCA	GGG	CCC	TTC	CTC	CAG	TAG	C	3'	N403-424
604	5'	CTC	CTT	ATT	TCC	CTT	CAC	ACC	C	3'	N858-837
605	5'	AAT	ATC	AGG	TCA	TTG	GTG	GAG	A	3'	N715-736
606	5'	GCA	CAT	TTC	TTC	CCC	CAG	CAA	C	3'	N1278-1257
607	5'	CAT	TGC	CTC	TGA	ATT	CAA	CAC	A	3'	N1085-1106

608	5'	GGA	CAC	CCC	TTC	ACA	TTA	TTG	C	3'	N1684-1663
609	5'	TGT	ACC	CTG	CCC	TGC	TGG	TGG	A	3'	N1465-1486
610	5'	GCT	CAG	TTG	AAC	GCC	TTT	TGA	T	3'	N1879-1858
611	5'	TTT	CAC	CAT	AGA	ATC	CAG	TCC	G	3'	N156-135
612	5'	GCA	ATA	ATG	TGA	AGG	GGT	GTC	C	3'	N1663-1684

Überprüfung der genomischen Integration des K5-COX-2-Konstruktes

181/611: Produktgröße 332 bp; Annealing-Temperatur 56 °C

612/182: Produktgröße 279 bp; Annealing-Temperatur 56 °C

3' UTR des K5-COX-2-Konstruktes

633	5'	ATT	CCT	GCA	GCC	CAA	CAT	CTG	T	3'	bK5 3'-UTR fw
687	5'	AGA	GGA	GAA	AAC	TTG	GCT	TGA		3'	bK5 3'-UTR fw

663/687: Produktgröße: 460 bp; Annealing-Temperatur: 54°C

Maus β -Aktin

24	5'	AAA	CTG	GAA	CGG	TGA	AGG	C	3'	N1402-1420
25	5'	GCT	GCC	TCA	ACA	CCT	CAA	C	3'	N1831-1813

24/25: Produktgröße 429 bp; Annealing-Temperatur: 54°C

3.13 Bakterienmedien

Ampicillin	Sigma, Steinhausen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, MI, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, MI, USA
Carbapenicillin	Sigma, Steinhausen
Glucose	Sigma, Steinhausen
Maltose	Sigma, Steinhausen

LB-Medium	10 g Bacto-Trypton, 5 g Bacto-Hefeextrakt, 10 g NaCl pro 1 Liter
LB-Agar	LB-Medium mit 15 g Bacto-Agar pro 1 Liter
SOB-Medium	20 g Bacto-Trypton, 5g Bacto-Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, nach Autoklavieren Zugabe von 10 ml steril filtrierter Mg-Lösung (1 M MgCl_2 , 1 M MgSO_4) pro 1 Liter
SOC-Medium	SOB-Medium mit 20 mM Glucose
Selektionsantibiotika	Ampicillin 50 $\mu\text{g/ml}$ Carbpenicillin 50 $\mu\text{g/ml}$

3.14 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Actrapid-Insulin, 40 iE/ml	Novo Nordisk
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinhausen
DMEM	Biochrom, Berlin
FKS	Gibco RCC, Basel, Schweiz
G418	Sigma, Steinhausen
Hormonsolvent	Sigma, Steinhausen
Hydrocortison	Fluka, Neu-Ulm
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Merck, Darmstadt
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \times 3 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
MEM essentielle Aminosäuren (50x)	Biochrom, Berlin
MEM nicht-essentielle Aminosäuren (100x)	Biochrom, Berlin
MEM Vitmanine (100x)	Biochrom, Berlin
$\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$	Merck, Darmstadt
NaCO_3 (7,5 %)	Biochrom, Berlin
N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom, Berlin
Natriumpyruvat (100 mM)	Biochrom, Berlin
Poly-L-Ornithin	Sigma, Steinhausen
Prolactin	Sigma, Steinhausen
Trypsin	Biochrom, Berlin

PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,2
Trypsinlösung PBS	2,5% (w/v) Trypsin, 0,05% (w/v) EDTA in PBS
Poly-L-Ornithin-Transfektion ser	Lösung 1: 10 mg Polyornithin/ml deion. Was- ser Lösung 2: 28% DMSO in H ₂ O
<i>Färbelösungen für β-Gal-Transfektionskontrolle</i>	
x-Gal-Lösung	2% (w/v) in Dimethylformamid
K ₃ [Fe(CN) ₆]-Lösung	500 mM K ₃ [Fe(CN) ₆]
K ₄ [Fe(CN) ₆]-Lösung	500 mM K ₄ [Fe(CN) ₆]
MgCl ₂ -Lösung	1 M MgCl ₂ x 6 H ₂ O
<i>Medium für BMGE⁺-Zellen</i>	
KE-Medium	400 ml Dulbecco's MEM (80%), 4,5% Glucose 5 ml 200 mM n-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin 5 ml 100 mM Natriumpyruvat 100 ml FKS (20%) KE-Hormone: 1 ml Prolactinlösung (416 μ l 6 mg Prolac- tin/ml Hormonsolvent zu 5 ml DMEM) 1 ml Insulinlösung (1 ml Insulin/2 ml DMEM) 2 ml Hydrocortisonlösung (2,5 mg Hydrocorti- son/ml Ethanol)

3.15 Lösungen für die molekulargenetischen Methoden

3.15.1 Plasmid-Minipräparation (QIAGEN)

P1	Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 100 µg RNase A/ml pH 8,0
P2	Lysepuffer	200 mM NaOH, 1% SDS
N3	Neutralisationspuffer	2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8
PB	Waschpuffer 1	50 mM MOPS, 1 M NaCl, 15% Ethanol, pH 7,0
PE	Waschpuffer 2	50 mM Tris/HCl, 1,25 M NaCl, 80% Ethanol, pH 8,5
EB	Elutionspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

3.15.2 Plasmid-Maxi-Präparation (QIAGEN)

P1 und P2		siehe Mini-Plasmid-Präparation
P3	Neutralisationspuffer	3 M Kaliumacetat, pH 5,5
QBT	Equilibrierungspuffer	50 mM MOPS, 1 M NaCl, 15% Ethanol 0,15% Triton X-100, pH 7,0
QC	Waschpuffer	50 mM MOPS, 1 M NaCl, 15% Ethanol, pH 7,0
QF	Elutionspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,5

3.15.3 Gelextraktion (QIAGEN)

PB	Waschpuffer 1	50 mM MOPS, 1 M NaCl, 15% Ethanol, pH 7,0
PE	Waschpuffer 2	50 mM Tris/HCl, 1,25 M NaCl, 80% Ethanol, pH 8,5
EB	Elutiospuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,5

3.15.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsiematerial

Proteinase K	10 mg/ml
Proteinase K-Puffer	50 mM Tris/HCl, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl
	1% SDS, pH 8,0

3.15.5 DNA-Agarosegelelektrophorese

1x TBE-Puffer	0,1 M Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,5
DNA-Probenpuffer	50% Glycerin, 15 mM EDTA, 0,15% Bromphenolblau, 0,15% Xylencyanol, pH 7,4
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml in TE-Puffer

3.15.6 RNA-Agarosegelelektrophorese

1x MOPS-Puffer	40 mM MOPS, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA mit Essigsäure auf pH 7,0 einstellen
RNA-Probenpuffer	66% Formamid, 8% Formaldehyd, 0,01% Bromphenolblau, 0,1 mg/ml Ethidiumbromid, 5% Glycerin in 1x MOPS

3.15.7 Nukleinsäuretransfer

Southern Blot

20x SSC-Puffer	3 M NaCl, 0,3 M tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0
----------------	--

Northern Blot

40x Genescreen (GS)-Puffer	0,25 M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ (1:1), pH 6,5
----------------------------	---

3.15.8 Hybridisierung von Nukleinsäuren

1 M „NaHPO ₄ “	1 M Na ₂ HPO ₄ mit 83% H ₃ PO ₄ auf pH 7,2
H7-Mix	0,5 M „NaHPO ₄ “, 1% BSA, 7% SDS, 1 mM EDTA, pH 7,2
Waschpuffer 1	2x SSC, 0,1% SDS
Waschpuffer 2	0,5x SSC, 0,5% SDS
Waschpuffer 3	0,1x SSC, 0,5% SDS

Southern Blot

Depurinierungslösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung	0,4 M NaOH

Northern Blot

FAI-Puffer	50 mM NaOH, 10 mM NaCl
------------	------------------------

3.16 Lösungen für Tierversuche

Mikroinjektiospuffer	10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4
DMBA	1 µmol/ml in Aceton
TPA	0,1 µmol/ml in Aceton
Arachidonsäure	100 mg/ml in Aceton

Futter

Inhibitor 1 (SC-58635)	1500 ppm	K. Seibert, Pharmacia/Searle, USA
Inhibitor 2 (SC-65872)	500 ppm	K. Seibert, Pharmacia/Searle, USA

3.17 Lösungen für biochemische Methoden

3.17.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid-Stammlösung	30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, 0,4% SDS, pH 8,8
10x Laufpuffer	1,5 M Tris/HCl, 1% SDS, 1,25 M Glycin, pH 8,3
Laemmli-Probenpuffer	0,5 M Tris/HCl, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin 3% SDS, 0,01% Bromphenolblau, pH 6,8

3.17.2 Western-Transfer

Anodenpuffer I	0,3 M Tris, 20% Methanol, pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20% Methanol, pH 10,4
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Norleucin, 20% Methanol, pH 9,4
Ponceau S-Lösung	0,5% Ponceau S in 1% Essigsäure

3.17.3 Immunblot-Nachweis von Proteinen

Tropix-Protokoll

Waschpuffer (PBS/T)	1x PBS, 0,1% Tween 20
Blocklösung	1x PBS, 0,2% I-Block-Reagenz, 0,1% Tween 20
10 x Assay-Puffer	200 mM Tris/HCl, 10 mM MgCl ₂ , pH 9,8
CSPD-Substrat-Lösung	Nitroblock 1:20 (v/v) in 0,25 mM CSPD-Lösung

3.17.4 Homogenisierungspuffer

COX	50mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1% Tween 20, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mM PMSF, pH 7,4
-----	--

bei Gewebeproben enthielten die Homogenisierungspuffer zusätzlich 0,2 mg/ml α_2 -Makroglobulin

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 DNA-Isolierung

4.1.1.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurde der QIAprep Spin Miniprep Kit verwendet. Bei dieser Methode der Plasmidpräparation wurden die Bakterien zunächst durch alkalische Lyse (modifizierte Methode nach Birnboim und Doly, 1979) aufgeschlossen. Dann wird die Plasmid-DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an Silikamembran-Säulen gebunden und anschließend unter Niedrigsalzbedingungen eluiert.

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden 4 ml Bakteriensuspension einer 7,5 ml-Über-Nacht-Kultur bei 1000x g für 10 min zentrifugiert. Das erhaltene Bakteriensediment wurde in 250 µl RNase-haltigem P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgt nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer. Nach einer 5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Lysevorgang durch Zugabe von 350 µl N3-Puffer beendet und die Proben 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Der klare Überstand wurde auf die Säulen aufgetragen und diese 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl PB-Puffer und 750 µl PE-Puffer gewaschen. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 40 µl TE-Puffer durch eine 1 min Zentrifugation bei 13000 Upm.

4.1.1.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Der Plasmid Maxi Purification Kit wurde zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA eingesetzt. Die Bakterien werden hierbei im Alkalischen lysiert, die Plasmid-DNA unter Niedrigsalzbedingungen an die Anionenaustauschersäule gebunden und mit einem Hochsalzpuffer eluiert und durch Isopropanol präzipitiert.

Dazu wurden 400 ml Über-Nacht-Kultur 15 min bei 800x g zentrifugiert und das Bakteriensediment in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer und 5 min Lyse bei Raumtemperatur wurden 10 ml gekühlter P3-Puffer zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert.

Die Probe wurde anschließend bei 20 000x g für 30 min zentrifugiert. Der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde über einen Faltenfilter auf die mit 10 ml QBT-Puffer equilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit je 30 ml QC-Puffer gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte durch Zugabe von 0,7 Volumenanteil Isopropanol. Anschließend wurde 45 min bei 15 000x g und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene DNA-Sediment wurde mit 5 ml 70%

Ethanol gewaschen, 5 min an der Luft getrocknet und in 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 aufgenommen.

4.1.1.3 DNA-Isolierung aus Schwanzbiopsien

Zur Überprüfung der Integration des K5-COX-2-Konstruktes in das Mausgenom wurden von 4-5 Wochen alten Tieren Schwanzbiopsien genommen, die genomische DNA isoliert und diese durch Southern Blot und PCR mit Transgen-spezifischen Primerpaaren analysiert.

Hierzu wurden 0,5 cm lange Schwanzspitzen über Nacht bei 57°C in Proteinase-K-haltigem Puffer aufgeschlossen. Durch Zugabe von 300 µl 5 M NaCl-Lösung und anschließendem 5 min Schütteln wurde die DNA solubilisiert. Nach der Abtrennung von Gewebefragmenten und Haaren durch eine 10 min Zentrifugation bei 13500 Upm (Sigma-Tischzentrifuge) wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 1/3 Volumen Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde durch eine 10 min Zentrifugation bei 13500 Upm sedimentiert, zweimal mit kaltem 70% Ethanol gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50-100 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,0 resuspendiert.

4.1.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA und DNA-Proben wurde die optische Dichte bei 260 nm und 280 nm gemessen. Für doppelsträngige DNA entspricht eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml, für RNA von 40 µg/µl und von 33µg/ml für Oligonukleotide bzw. einzelsträngige DNA.

Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluß über den Verunreinigungsgrad der Nukleinsäureprobe durch Proteine. Für reine Nukleinsäuren sollte der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ Werte zwischen 1,8 und 2,0 annehmen.

4.1.3 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsendonukleasen wurden unter den vom Hersteller angegebenen Reaktionsbedingungen eingesetzt. Zu 600 ng Plasmid-DNA wurden 1 µl mitgelieferter 10x Reaktionspuffer sowie 2-5 Units Restriktionsenzyme gegeben und mit sterilem Aqua bidest auf 10 µl Reaktionsvolumen aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte bei der optimalen Reaktionstemperatur der jeweiligen Restriktionsenzyme. Die Inkubationszeit betrug 1 - 2 Stunden.

4.1.4 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die präparative als auch analytische Auftrennung von DNA-Fragmente sowie die Analyse von PCR-Produkten anhand ihrer Molekulargewichte erfolgte unter nativen Bedingungen in Agarose-Flachbett-Gelen. Um eine optimale Auftrennung der DNA-Fragmente zu erzielen, wurde die Agarosekonzentration zwischen 0,8 und 1,4% variiert.

Als Gel- und Elektrophoresepuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose mit TBE-Puffer in einem Mikrowellengerät schlierenfrei aufgeköcht. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro 100 ml Gelvolumen wurde die Agaroselösung in eine abgedichtete Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Vor dem Gelauftrag wurden die Proben mit 1/5 Volumen Gelladepuffer versetzt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 10-15 V/cm² und dauerte je nach Gelgröße 1-2 Stunden. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und zur Dokumentation photographiert.

4.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen mit dem QIAquick-Spin Kit

Diese Methode der DNA-Isolierung aus Agarosegelen basiert auf dem Prinzip der Adsorption von DNA an Silica-Gel-Oberflächen in Gegenwart hoher Konzentrationen von chaotropen Salzen (Vogelstein und Gillespie, 1979) und anschließender Elution der DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen.

Die aufzuarbeitenden DNA-Banden wurden aus dem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Zu je 100 mg Agarosegel wurden jeweils 300 µl QG-Puffer gegeben. Anschließend wurden die Proben bei 50°C erhitzt bis die Agarose vollständig geschmolzen war. Nach Zugabe von 100 µl Isopropanol pro 100 mg Agarosegel wurden die Proben in 800 µl Fraktionen auf die QIAquick Säulen aufgetragen und diese anschließend 1 min bei 13000 Upm zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Der Durchfluß wurde verworfen, 500 µl QG-Puffer auf die Säulen gegeben und zentrifugiert. Danach wurden die Säulen mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zum vollständigen Entfernen des PE-Puffers wurde der Zentrifugationsschritt nach dem Verwerfen des Waschdurchflusses wiederholt. Die DNA wurde mit 40 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,5 eluiert und die DNA-Konzentration wurde durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt und in einem Testgel mit Standard-DNA verglichen.

4.1.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden DNA-Fragmente zwischen zwei antiparallel zueinanderliegenden, an DNA hybridisierten Primern exponentiell amplifiziert. Diese Methode wurde zur Überprüfung der genomischen Integration des K5-COX-2-Konstruktes genutzt. Außerdem wurden mit Hilfe spezifischer Primer bestimmte DNA-Sequenzen für anschließende Klonierungsreaktionen amplifiziert.

Für eine analytische PCR wurden 250 ng DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 0,4 µl dNTP-Mix (jedes 25 mM), jeweils 5 µl des 3' und 5'-spezifischen Primers (10 pmol/µl) zusammenpipettiert, mit Aqua bidest auf ein Volumen von 49,5 µl aufgefüllt und 0,5 µl Taq-Polymerase (5U/µl) zugegeben.

Alternativ wurde die genomische Integration des Konstruktes mit dem Red-Taq-Polymerase-System von Sigma analysiert, das den Gelladepuffer bereits im PCR-Ansatz enthält. Dieser setzt sich pro Reaktion aus 250 ng DNA, 2,5 µl 10x Reaktionspuffer, je 2,5 µl 3'- und 5'-Primer, 0,4 µl dNTPs und 1,25 µl RedTaq zusammen. Der Reaktionsansatz wird durch Zugabe von sterilem Aqua bidest auf ein Volumen von 25 µl eingestellt.

Der Reaktionsansatz einer präparativen PCR besitzt ein Reaktionsvolumen von 100 µl und beinhaltet 500 ng DNA, 10 µl 10x Reaktionspuffer, je 10 µl 3'- und 5'-Primer, 1 µl dNTPs und 5 U Polymerase. War die Klonierung des PCR-Produktes in Expressionsvektoren geplant, erfolgte die PCR-Reaktion mit der Pwo-Polymerase, die eine Proofreading-Aktivität besitzt.

Die PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler durchgeführt. Die Annealing Temperatur des PCR-Programmes wurde in Abhängigkeit des Schmelzpunktes der Primersequenzen gewählt. In der Regel wurden 30-35 Zyklen von Denaturierung, Annealing und Polymerasereaktion durchlaufen. Tabelle 1 faßt die am häufigsten benutzten Programme zusammen.

Tab.1: PCR-Programme

	PROGRAMME			
	Taq 56	Taq 54	KM1	Pwo 58
Denaturierung	95°C für 90 sek	95°C für 90 sek	94°C für 60 sek	95°C für 90 sek
Annealing	56°C für 90 sek	56°C für 90 sek	52°C für 60sek	55°C für 90 sek
Elongation	70°C für 2 min	70°C für 2 min	72°C für 60 sek	70°C für 3 min
Denaturierung	72°C für 10 min	72°C für 10 min	72°C für 10 min	72°C für 15 min
Zyklenzahl	30	30	35	30

Zur Kontrolle und Auswertung der PCR wurden anschließend 10 µl der Ansätze elektrophoretisch im Agarosegel überprüft.

4.1.7 Sequenzierung mittels ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxymethode nach Sanger et al. (1977). Der Reaktionsablauf gliedert sich in drei Abschnitte: Denaturierung der doppelsträngigen DNA, Hybridisierung der synthetisierten Primer an die Zielsequenz (Annealing) und Polymerase-reaktion (Elongation) zur Verlängerung und Markierung der Nukleotidketten. Im Gegensatz zur klassischen Kettenabbruchmethode nach Sanger waren die 4 ddNTPs mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die Auftrennung und Detektion der Polymeraseprodukte erfolgte im ABI Prism 310 Genetic Analyzer.

Der Reaktionsansatz einer Sequenzierungsreaktion setzte sich aus 1,2 µl DNA (1 µg/µl), 13,8 µl Aqua bidest, 1 µl Primer und 4 µl Sequenzierungsmix zusammen. Das Sequenzierungsmix beinhaltete die 4 dNTPs, die 4 fluoreszenzmarkierten ddNTPs, Reaktionspuffer und die thermostabile Polymerase.

Die im Thermocycler ablaufende Polymerase-Reaktion (Programm ABI 3) umfaßte 30 Zyklen aus 15 sek Denaturierung bei 95°C, 5 sek Annealing bei 58°C und 4 min Elongation bei 60°C.

Anschließend wurden die DNA-Fragmente durch Zugabe von 80 µl deionisiertem Wasser, 10 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl absoluten Ethanol präzipitiert und durch 15 min Zentrifugation bei 15300 Upm (Sigma-Zentrifuge) sedimentiert. Der Zentrifugationsüberstand wurde vorsichtig abgenommen und das DNA-Präzipitat zweimal mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurden die DNA-Präzipitate an der Luft getrocknet, in 20 µl Template Suppression Reagenz aufgenommen und im ABI Prism 310 Genetik Analyzer ausgewertet.

4.1.8 Aufreinigung von PCR-Fragmenten

Das Aufreinigungsprinzip des High Pure PCR Product Purification Kit basiert auf der Bindung längerkettiger DNA-Fragmente (>375 bp) an Glasfaseroberflächen in Gegenwart chaotroper Salze (Vogelstein und Gillespie, 1979). Für Oligonukleotide von weniger als 100 bp ist die Bindung an die Glasfaseroberfläche unter Auflösung der Hydrathülle energetisch ungünstig. Die Elution der langkettigen DNA-Fragmente erfolgt unter Niedrigsalzbedingungen.

Zu je 100 µl PCR-Ansatz wurden 500 µl Bindungspuffer gegeben, gemischt und auf die High Pure Filtrationssäule aufgetragen. Nach einer 1 min Zentrifugation bei 13000 Upm (Eppendorffzentrifuge) wurde das Eluat verworfen wurde die Säule zweimal mit 500 bzw. 200µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 50 µl 10 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,5 eluiert.

4.1.9 Klonierungsmethoden

4.1.9.1 Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

Für die Generierung verschiedener cDNA-Expressionsvektor-Konstrukte wurden die Vektoren durch Inkubation mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert und elektrophoretisch im Agarosegel aufgetrennt und aufgereinigt. Um eine Rezirkularisierung der Vektoren bei der anschließenden Ligationsreaktion zu vermeiden, wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen durch eine Behandlung mit alkalischer Phosphatase aus Shrimps (SAP) abgespalten.

Zur Dephosphorylierung von 2 µg 5'-phosphorylierter, linearisierter DNA mit glatten Enden wurden 3 U SAP (1 U/0,1 pmol glatte Enden) eingesetzt und 60 min bei 37°C inkubiert. Für eine Dephosphorylierung 5'-rezessiver Enden wurden 2 µg linearisierte Plasmid-DNA 10 min bei 37°C mit 1 U SAP (1 U/1 pmol rezessive Enden) behandelt.

Anschließend wurde die SAP durch eine 15 min Inkubation bei 65°C inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde direkt in die Ligationsreaktion eingesetzt.

4.1.9.2 Ligation

Für die Ligation wurden 50-100 ng Vektor- und Insert-DNA in molaren Verhältnissen von 1:3, 1:5 und 1:10 eingesetzt. Dazu wurden 1 µl 10x Ligasereaktionspuffer und 1 µl T4-Ligase (1 U/µl) gegeben und auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl mit AQUA bidest aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 12-16°C inkubiert.

4.1.9.3 Transformation von Bakterien

Zur Transformation der Expressionsvektoren wurden superkompetente Sure2-Bakterien eingesetzt, die eine Transfektionseffizienz von 10^8 besitzen. Aufgrund der geringen Ligationsausbeute und der schlechten Transformierbarkeit der über 10 kb großen Expressionsvektoren wurde der gesamte Ligationsansatz von 20 µl auf 100 µl auf Sure2-Bakterien gegeben, die zuvor auf Eis aufgetaut worden waren. Nach vorsichtigem Durchmischen wurde der Transformationsansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock von 45 sek bei 42°C. Nach einer 2 min Inkubation auf Eis wurden 450 µl SOC-Medium zur Bakteriensuspension gegeben und 45-60 min bei 37°C geschüttelt.

Der gesamte Transformationsansatz wurde auf einer carbpenicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die gewachsenen Einzelkolonien transformierter Bakterien wurden mit einem sterilen Zahnstocher in Flüssigkulturen überführt und unter Selektionsbedingungen (Carbpenicillin 50 mg/ml) vermehrt.

4.1.9.4 TOPO-TA-Klonierung

Die Klonierung von PCR-Fragmenten zur Gewinnung von Hybridisierungs sonden oder zur Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits. Mit Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Fragmente tragen am 3' Ende ein zusätzliches Adenin über das die Ligation in den pCR-TOPO-Vektor erfolgt.

Hierzu werden 0,5-2 μ l (10 ng) PCR-Produkt zu 1 μ l pCR-TOPO-Vektor gegeben und das Volumen mit Aqua bidest auf 5 μ l eingestellt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf Eis gestellt.

Zur Transformation wurden 2 μ l dieser Reaktion zu, mit 2 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol vorbehandelten, kompetenten One Shot-Bakterien gegeben. Der vorsichtig durchgemischte Ansatz 30 min inkubiert, 30 sek einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und dann 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden die Bakterien nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium 30 min bei 37°C inkubiert. Die Bakterien auf LB-Ampicillin-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C wachsen lassen. Anhand von Blau-Weiß-Selektion wurden pro Ligationsansatz 12 Klone für die Animpfung von 7,5 ml Kulturen ausgewählt.

4.1.10 RNA-Isolierung aus Zellen

Die Extraktion von RNA aus Gewebekulturzellen erfolgte mit Hilfe des RNA-Clean-Kits. Dazu wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 2 ml RNA-Clean-Lösung pro 100 mm Petrischale mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in einer 10 ml Pipette wurde das Homogenat in Corex-Röhrchen überführt. Zur Extraktion der RNA wurden pro 2 ml Extraktionslösung 0,3 ml Chloroform zugegeben, geschüttelt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung in RNA-haltige, wässrige Oberphase, Interphase und organische Phase (DNA, Proteine) wurde durch eine 15 min Zentrifugation mit 12000x g bei 4°C erzielt. Anschließend wurde die RNA-haltige Oberphase in ein frisches Corex-Röhrchen überführt und die RNA durch Zugabe von 1 Volumen Isopropanol gefällt. Nach einer 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA durch eine 15 min Zentrifugation mit 12000x g bei 4°C sedimentiert, das RNA-Sediment zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, außerdem wurde die isolierte RNA im Agarosegel auf Intaktheit und Reinheit überprüft.

4.1.11 RNA Isolierung aus Gewebe

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgeweben wurden die in flüssigen Stickstoff eingeforenen und bei -70°C gelagerten Organe in, zuvor in flüssigem Stickstoff gekühlten, Teflonkapseln mit einer Kugelschwingmühle pulverisiert (2 x 30 sek bei maximaler Schwingzahl). Das Gewebepulver wurde in 3 ml RNA-Clean durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren homogen suspendiert und anschließend zur Extraktion der RNA 0,6 ml Chloroform zugegeben.

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Maus-Epidermis wurde diese bei -70° mittels eines sterilen Skalpells von der Dermis und dem darunter liegenden Fettgewebe abgeschabt. Die Epidermisflocken wurden in der Kugelschwingmühle pulverisiert in 3 ml RNA-Clean suspendiert und anschließend mit 0,6 ml Chloroform versetzt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog zur Isolierung von RNA aus Zellen.

4.1.12 RNA-Agarose-Gel

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte im 1,4% Agarosegel. Dazu wurden 1,4 g Agarose mit 90 ml Aqua bidest in der Mikrowelle schlierenfrei aufgeköcht. Nach Abkühlen der Gellösung auf 60°C wurden 10 ml 10x MOPS-Puffer zugemischt und die Gellösung in eine abgedichtete Horizontalgelkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x MOPS-Puffer verwendet.

Zur Überprüfung einer RNA-Präparation wurden 1,5 μg , für einen Northern Blot 10 μg RNA in einem Volumen von 10 μl mit gleichem Volumen FA-Mix versetzt und für 15 min bei 65°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophoresedauer betrug bei 10 V/cm² 1,5 bis 2 Stunden.

4.1.13 Nukleinsäuretransfer-Methoden

4.1.13.1 Northern Transfer

Das 1,4% Agarosegel wurde nach der Elektrophorese zuerst in monodestilliertem Wasser gewaschen und 20 min in FA-Puffer geschwenkt. Nach dreimaligem Waschen in monodestilliertem Wasser wurde das Gel zwei mal 15 min in 1x GS-Puffer äquilibriert.

Zum Transferieren der RNA auf eine Hybond-N⁺-Membran mittels Kapillarkraft wurde 1x GS-Puffer als Transferpuffer eingesetzt und folgender Transferblot aufgebaut. In ein als Pufferreservoir dienendes Tablett wurden zwei in Transferpuffer getränkte Haushaltsschwämme gelegt. Darauf wurden 3 mit Transferpuffer befeuchtete, schwammgroße 3MM Whatmanfilterpapiere luftblasenfrei aufgelegt. Auf diese wurden das Agarosegel, mit der

Oberseite nach unten, und die Membran luftblasenfrei übereinander gelegt. Die nächste Schicht bildeten 3 gelgroße, mit GS-Puffer befeuchte 3MM Whatmanfilterpapiere. Darauf wurde eine 2 cm dicke Schicht von trockenen, auf Gelgröße zurechtgeschnittenen 3MM Whatmanfilterpapieren platziert. Die oberste Schicht des Blots bestand aus einem 8 cm dicken Stapel von Hostess Saugpapieren. Der Blot wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 1 kg beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht, wobei 1x GS- Puffer in das Pufferreservoir nachgefüllt wurde.

Die transferierte RNA wurde auf der Membran durch UV-Crosslinken im UV-Crosslinker (Programm Auto Cross Link, 1200 μ Joules) immobilisiert. Zur Dokumentation des Transfers wurde die Membran unter UV-Licht photographiert und bis zur Hybridisierung in Frischhaltefolie bei 4°C gelagert.

4.1.13.2 Southern Transfer

Der DNA-Transfer und die Hybridisierung zum Nachweis der transgenen Keratin-Promotor- COX-2-Sequenzen zur Genotypisierung der Foundertiere und ihrer Nachkommen erfolgte nach der von Southern (1975) etablierten Methode.

Die aus Schwanzbiopsien isolierte genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (EcoRI) geschnitten, und die erhaltenen DNA-Fragmente im 0,8% Agarosegel aufgetrennt.

Anschließend erfolgte eine partielle Depurinierung der DNA durch 10 min Behandlung des Geles mit 0,25 N HCl. Dies begünstigt die darauffolgende Denaturierung der DNA in kleinere, besser zu transferierende Einzelstrangfragmente. Hierfür wurde das Gel 3 x 15 min in 0,4 N NaOH inkubiert. Nach 10 min Äquilibration in 20 x SSC erfolgte der DNA-Transfer aus dem Gel auf eine Nylonmembran durch Kapillarkräfte analog zum unter 4.1.13.1 beschriebenen Northern-Blot-Aufbau. Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet.

4.1.13.3 Hybridisierung

Die mit 2x SSC-Puffer befeuchtete Membran wurde luftblasenfrei an der Wand einer Glashybridisierungsröhre ausgebreitet. Nach Zugabe von 10 ml 60°C warmen H7-Mix erfolgte die Vorhybridisierung zur Absättigung der unspezifischen Bindungskapazitäten der Membran im Rollhybridisierungs-Ofen bei 60°C für mindestens 4 Stunden. Die 32 P-markierte DNA-Sonde wurde 10 min bei 100°C denaturiert. Danach wurden $1,4 \times 10^7$ cpm (2×10^6 cpm/ml) zu 7 ml 60°C warmem H7-Mix gegeben und damit die Vorhybridisierungslösung ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Rollhybridisierungs-Ofen bei 60°C. Diesem Vorgang schlossen sich folgende Waschschrte der Membran an: zweimal 15 min mit Wasch 1 bei Raumtemperatur, je 20 min mit Wasch 1, Wasch 2 und Wasch 3 bei 60°C. Anschließend wurde die Membran in Klarsichtfolie verschweißt. Die Detektion der radioaktiven Signale erfolgte durch Exposition von Kodak-X-Omat-Röntgenfilmen

bei -70°C in Röntgenfilmkassetten mit Verstärkerfolien. Je nach Signalintensität variierte die optimale Expositionszeit zwischen 6 h und 8 Tagen.

4.1.13.4 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden wurde mit dem Megaprime™ Labeling Plus Kit durchgeführt. Diese Methode basiert auf der statistischen Hybridisierung von verschiedenen Hexanukleotiden an einzelsträngige DNA, die dann als Primer für die anschließende Klenow-Polymerasereaktion dienen (Feinberg und Vogelstein, 1983).

Zur Markierung wurden 25-50 ng DNA zusammen mit 5 µl Primermischung mit Aqua bidest auf ein Volumen von 33 µl aufgefüllt und 10 min bei 95°C denaturiert. Nach einer kurzen Zentrifugation (30 sek) bei Raumtemperatur wurden 10 µl Nukleotid-Mix (A/G/T-Desoxy-nukleotide), 5 µl [α -³²P]-dCTP (50 µCi, spezifische Aktivität 3000 Ci/mmol) und 2 µl Klenow-Enzym zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 37°C inkubiert.

Die Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden und kurzkettigen Fragmenten erfolgte durch Gelfiltration mit G50-Sephadexsäulen (Nick Columns). Nach Äquilibration der Säule mit 3 ml TE-Puffer pH 7,5 wurde der Markierungsansatz aufgetragen, die Säule einmal mit 400 µl TE-Puffer gewaschen und die markierte DNA mit weiteren 400 µl TE-Puffer eluiert. Die spezifische Aktivität des Eluats wurde durch Messung der Cerenkov-Zerfälle pro Minute eines 4 µl Aliquots im Szintillationszähler ermittelt.

4.1.14 Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur Synthese von einzelsträngiger cDNA aus Gesamt-RNA wurde der RT-PCR-Core Kit eingesetzt.

Pro RT-PCR Ansatz wurde 1 µg Gesamt-RNA mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 3 µl eingestellt, die RNA 15 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Pro RT-Reaktionsansatz wurden 4 µl MgCl₂, je 2 µl dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2 µl 10x Puffer II, 1 µl Oligo-dT-Primer (50 µM), 1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl) und 1 µl MuLV (Maus Leukemia Virus) Reverse Transkriptase (50 U/µl) zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die reverse Transkriptase Reaktion für 15 min bei 42°C. Abschließend wurde die Reverse Transkriptase durch 5 min Erhitzen bei 99°C denaturiert.

Als Template für die PCR-Reaktion wurden 1 µl der synthetisierten cDNA eingesetzt. Hierzu wurden je 2 µl genspezifische 5' und 3' Primer (10 pmol), 0,8 µl dNTPs (jedes Nukleotid 25 mM) sowie 5 µl 10x Reaktionspuffer gegeben und das Volumen mit sterilen Aqua bidest auf 49,5 µl eingestellt. Nach Zugabe von 0,5 µl Taq-Polymerase erfolgte die Amplifikation des gewünschten DNA-Segmentes im Thermoblock.

4.2 Transfektionsmethoden

4.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Pro Transfektionsansatz wurden $1,0 \times 10^6$ Zellen je 100 mm Petrischale ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch 5 ml frisches Kulturmedium pro Petrischale ersetzt. Der Transfektionsansatz bestand pro Petrischale aus 10 µg DNA I (zu exprimierendes Konstrukt), 1 µg DNA II (Transfektioeffizienz steigernde DNA), 25 µl Lösung S1 und 250 µl Lösung S2. Das Volumen wurde mit sterilem Aqua bidest auf 500 µl aufgefüllt. Zur Bildung der DNA-Calciumphosphat-Komplexe wurde der Ansatz 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Transfektionsansatz tropfenweise unter ständigem leichtem Schwenken der Petrischale auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden über Nacht (16 h) unter den regulären Kulturbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen. Die Transfektionseffizienz wurde 48 h später durch eine β -Galactosidase-Färbung der Zellen bestimmt.

4.2.2 Poly-Ornithin-Transfektion

Für die Transfektion mit der Poly-Ornithin-Methode wurden $0,5 \times 10^6$ BMGE⁺-Zellen pro 60 mm Petrischale ausgesät und zu 50% Konfluenz kultiviert. Nach dem Waschen der Zellen mit 37°C warmen PBS wurde die Transfektionslösung bestehend aus 1,8 ml Kulturmedium, 2,2 µl Poly-Ornithin (12 µg/ml) sowie 30 µg der zu transfizierenden DNA auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde die transfizierte Kultur für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektionslösung wurde vollständig abgesaugt und durch 3 ml 28% DMSO-Lösung für exakt 4 min bei Raumtemperatur ersetzt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit Kulturmedium wurden diese für weitere 48 h bei 37°C, 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert.

Die Transfektionseffizienz wurde durch Transfektion des pcDNA3- β -Gal-Plasmides in Parallelkulturen kontrolliert.

4.2.3 Selektion stabil transfizierter Zellen

Zur Isolierung stabil transfizierter Zellklone ist es notwendig, eine Antibiotikaresistenz zum Beispiel für Geneticin (G418) in die Zellen einzubringen. Kodiert die zu transfizierende DNA nicht für eine Antibiotikaresistenz, so muß die Resistenz durch Kotransfektion mit einem zweiten Resistenz-kodierenden Plasmid generiert werden.

Die transient transfizierten Zellen wurden entweder direkt charakterisiert oder zum Heranziehen stabiler Transfektanten in den Verhältnissen 1:3, 1:5 und 1:10 passagiert und 24 h

später mit dem Selektionsmarker Geniticin (G418; 100 mg/ml) behandelt. Ein Mediumwechsel erfolgte alle 72 h.

Die G418-Behandlung (100mg/ml) wurde fortgesetzt bis sich resistente, isoliert liegende Zellkolonien gebildet hatten. Diese wurden dann mit Hilfe von Klonierungsringen gezielt durch Zugabe von 70 μ l Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und weiter unter Selektionsbedingungen auf 24-Gefäß-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Nach und nach wurden die Zellen in größere Kulturschalen passagiert bis hin zur 100 mm Petrischale. Dabei mußte der Selektionsdruck durch G418 stets aufrechterhalten werden.

4.2.4 β -Galactosidase-Test

Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurden Parallelkulturen mit dem β -Galactosidase kodierenden Plasmid transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 5 min mit 4°C temperierten Ethanol fixiert. Danach wurde die Färbelösung bestehend aus 9 ml PBS, 90 μ l $K_3[Fe(CN)_6]$, 90 μ l $K_4[Fe(CN)_6]$, 28 μ l $MgCl_2$, 45 μ l x-Gal auf die Zellen gegeben und für 2 h bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Bestimmung der Transfektionseffizienz erfolgte durch Auszählung der blau gefärbten Zellen, die das Plasmid aufgenommen hatten und β -Galactosidase exprimierten.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Immunpräzipitation

4.3.1.1 Waschen und Aliquotieren der Protein-G-Sepharose

Die gequollene in 20% Ethanol konservierte Protein-G-Sepharose wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und in 45 ml PBS sorgfältig durch mehrmaliges Schütteln (Vortexen) suspendiert. Zum Sedimentieren der Protein-G-Sepharose wurde bei 4000 Upm (Kühlzentrifuge J2-21) für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand dekantiert und der Waschvorgang zweimal wiederholt. Abschließend wurde die Protein-G-Sepharose in 50 ml PBS mit 0,05% Natriumazid resuspendiert und in 500 μ l Aliquots bei 4°C gelagert.

4.3.1.2 Herstellung von Gewebshomogenaten

Für den Immunblotnachweis von Proteinen wurden Homogenate verschiedener Mausgewebe hergestellt.

Hierzu wurde die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet, die Organe entnommen und direkt in 2 ml eisgekühlten Homogenisierungspuffer überführt. Für Proteinhomogenate von Epidermis wurde die Haut zunächst für 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde die Epidermis von der Dermis gekratzt und in Homogenisierungspuffer überführt.

Die Homogenisierung der Gewebe erfolgte mit der Kinematika (Polytron 2x bis 2800 Upm). Vor der anschließenden Zentrifugation (Kühlzentrifuge J2-21, 4000 Upm, 4°C, 20min) wurden die Epidermishomogenate zur Entfernung der Haare über sterile Gaze filtriert.

Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration (4.3.3.) bestimmt. Für weitere Analysen wurden das Proteingemisch entweder über Nacht bei -20°C mit dem dreifachen Volumen Aceton gefällt, bei 13000 Upm (Biofuge, 4°C, 20 min) sedimentiert und in Laemmli-Proben-Puffer denaturiert oder in die Immunpräzipitation eingesetzt. Für die Herstellung von Proteinhomogenaten aus Zellkulturen wurden diese zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann entweder direkt homogenisiert oder bei -20°C eingefroren. Die Immunpräzipitation erfolgte wie unter 4.3.1.3 beschrieben.

4.3.1.3 Immunpräzipitation von COX-Isoenzymen

Die Anreicherung der COX-1 und -2 aus Zellysaten oder Gewebshomogenaten erfolgte durch Immunpräzipitation unter Verwendung spezifischer COX-Antisera (Müller-Decker et al., 1995). Als Kopplungsmatrix für das Fc-Fragment der eingesetzten Kaninchen-IgG-Antikörper wurde Protein-G-Sepharose benutzt.

Zum Homogenisieren wurden die Zellen mit 1 ml frischem Homogenisierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 mM EDTA; 1% Tween 20; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 1 mM PMSF) für 20 min auf Eis inkubiert und dabei lysiert. Alle folgenden Schritte wurden entweder auf Eis oder bei 4°C durchgeführt, um einen Abbau der zu präzipitierenden Proteine zu verhindern. Anschließend wurde der Zellrasen mit einem Schaber vom Plattenboden gelöst, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und durch 5 x 5-maliges Passieren in eine 1 ml Spritze mit einer 21 Gauge-Kanüle vollständig homogenisiert. Zum Abtrennen von Zelltrümmern wurde das Homogenat bei 4000 Upm und 4°C für 20 min zentrifugiert (Eppendorfszentrifuge). Der Überstand wurde in einem frischen Eppendorfgefäß gesammelt und die Proteinkonzentration bestimmt. Der Inkubationsansatz für die Immunpräzipitation setzte sich aus einem Aliquot Protein-G-Sepharose, 0,2-1 mg Protein-Homogenat, 5 µl affinitätsgereinigtes Kaninchen-anti-COX-2-Serum (vom Hasen 82) zusammen und wurde mit Homogenisierungspuffer auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt.

Der Ansatz wurde über Nacht bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Zum Sedimentieren des IgG-COX-2-Protein-G-Sepharose-Immunkomplexes wurde der Reaktionsansatz für 5 min mit 4000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die Immunpräzipitation von COX-1 aufbewahrt.

Der sedimentierte COX-2-Immunkomplex wurde in 1 ml Waschpuffer (Homogenisierungspuffer ohne Tween 20) resuspendiert und erneut durch Zentrifugation (4000 Upm, 5 min, 4°C) sedimentiert (Eppendorfszentrifuge). Dieser Waschvorgang wurde viermal wiederholt wobei im letzten Zentrifugationsschritt bei 13000 Upm sedimentiert wurde. Danach wurde der Überstand vollständig abgesaugt. Zum Freisetzen und Denaturieren der präzipitierten Proteine wurde das Sediment in 60 µl 2x Laemmli-Proben-Puffer (LSB) aufgenommen 5 min und auf 100°C erhitzt. Bis zur Immunblotanalyse wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Für die Immunpräzipitation der COX-1 wurden 800 µl des Überstandes der COX-2-Immunpräzipitation zusammen mit Protein-G-Sepharose und 5 µl Kaninchen-anti-COX-1-Serum (vom Hasen 50) für eine Stunde bei 4°C im Über-Kopf-Schüttler inkubiert. Die weitere Aufarbeitung des Immunpräzipitates erfolgte analog zu dem für COX-2 beschriebenen Protokoll.

Da das verwendete COX-1-Antiserum aus Kaninchen schwach mit COX-2-Protein kreuzreagiert, wurde aus dem Proteinhomogenat stets zuerst COX-2 und danach COX-1 präzipitiert.

4.3.2 Immunblotnachweis

4.3.2.1 Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli

Die Analyse der Proteinhomogenate sowie der Immunpräzipitate erfolgte durch diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli (1972). Hierfür wurden 1,5 mm dicke, 7,5% Polyacrylamidgele mit einer effektiven Trennstrecke von mindestens 12 cm eingesetzt. Die Trenngellösung setzte sich aus 19,6 ml Aqua bidest, 10 ml 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (30%/0,8%; v/v), 10 ml Trenngelpuffer, 20 µl TEMED und 0,45 ml frischem 10% Ammoniumperoxidisulfat (APS) zusammen. Um eine glatte Oberfläche zum Sammelgel zu erhalten, wurde das Trenngel nach dem Gießen sofort mit Aqua bidest überschichtet. Das Aqua bidest wurde vor dem Gießen des Sammelgels mit 3 MM Whatman Filterpapier aufgesaugt. Zur Herstellung des 4% Sammelgels wurden 12,4 ml Aqua bidest, 2,7 ml 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung, 5 ml Sammelgelpuffer, 20 µl TEMED sowie 60 µl 10% APS gemischt. Die Elektrophorese erfolgte mit 1x Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA über Nacht (Laufzeit ca. 16-18 h).

4.3.2.2 Western-Transfer

Die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden zum späteren immunologischen Nachweis auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran transferiert. Der Transfer erfolgte entsprechend der modifizierten Methode von Towbin et al. (1975) bzw. Kyshe-Andersen (1984) nach dem Semi-Dry-Prinzip.

Die PVDF-Membran sowie fünfzehn 3 MM Whatman Filterpapiere wurden auf Gelgröße zurechtgeschnitten. 6 Filterpapiere wurden in Anodenpuffer I getränkt und auf die Anodenplatte luftblasenfrei aufgelegt. Die nächste Schicht bildeten 3 Lagen in Anodenpuffer II befeuchtete Filterpapiere. Darüber wurde die zuvor in Ethanol vollständig benetzte und anschließend in Anodenpuffer II äquilibrierte PVDF-Membran ebenfalls luftblasenfrei gelegt. Das Polyacrylamidgel wurde in Kathodenpuffer äquilibriert und auf die Membran platziert. Die letzte Lage des Western-Blot-Aufbaus bildeten 6 in Kathodenpuffer eingeweichte 3 MM Whatman Filterpapiere. Zur Vermeidung von Kriechströmen während des Transfers wurde die überschüssige Puffermenge sorgfältig von der Anodenplatte gewischt. Nach dem Auflegen der Kathodenplatte wurde der gesamte Aufbau mit einem 1 kg Gewicht beschwert.

Um die Effizienz des Proteintransfers zu überprüfen und die aufgetragenen Molekulargewichtsreferenzen zu detektieren, wurde die PVDF-Membran 30 sek in Ponceau-S-Lösung angefärbt und die Referenzproteine mit Kugelschreiber umrandet. Zum Entfärben wurde mehrmals mit Aqua bidest gewaschen.

4.3.2.3 Nachweis mit dem Tropix[®]-Western-Light-Chemilumineszenz-Kit

Für den Nachweis der COX-Isoenzyme auf der PVDF-Membran wurde der Tropix[®]-Western-Light-Detection-Kit verwendet. Dieses Detektionsverfahren basiert auf der Erzeugung von Chemilumineszenz durch die Dephosphorylierung des CSPD-Substrates durch die mit dem sekundären Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase. Die Chemilumineszenz wird durch Röntgenfilmmexposition nachgewiesen.

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungskapazitäten wurde die PVDF-Membran eine Stunde in Blocklösung inkubiert. Danach wurde über Nacht bei 4°C mit den für COX-2 bzw., COX-1 spezifischen Antiseren inkubiert. Die Antiseren (Hase 82 für COX-2; Hase 50 für COX-1) wurden in einer 2000-fachen Verdünnung in Blocklösung/PBS-T (1:1, v/v) eingesetzt. Anschließend wurde die Membran 2 x 20 min in Blocklösung gewaschen. Der mit alkalischer Phosphatase konjugierte sekundäre anti-Kaninchen-IgG-Antikörper wurde 1:5000 in Blocklösung/PBST (1:1, v/v) verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für eine Stunde. Danach wurde die Membran 3 x 30 min in Blocklösung gewaschen.

Die gewaschene Membran wurde 2 x 5 min in Assaypuffer, pH 10 äquilibriert und für 5 min mit Nitroblock-CSPD-Substrat-Lösung inkubiert. Die überschüssige Substratlösung wurde durch Abtropfen auf saugfähigem Papier entfernt. Dann wurde die Membran luft-

blasenfrei in eine Plastikhülle gelegt, die zur Verminderung der elektrostatischen Aufladung gründlich mit Ethanol abgewischt wurde. Die Expositionszeiten der Röntgenfilme lagen je nach Signalstärke zwischen 5 sek und 10 min.

4.3.3 Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay

Das DC-Protein-Assay basiert auf der Proteinbestimmung nach Lowry.

7,5 µl Probenlösung bzw. BSA-Standard (0,25 - 2 mg/ml in Probenpuffer) wurden mit 37,5 µl frischem Reagenz A' (500 µl Reagenz A, 10 µl Reagenz S) versetzt und sofort gemischt. Danach wurden 300 µl Reagenz B hinzugegeben und der Ansatz erneut sofort gemischt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 750 nm im Elisa Reader gemessen.

4.4 Histologische Färbemethoden

4.4.1 Einbetten von Gewebe

Die entnommenen Gewebe wurden für Gefrierschnitte in Einbetttschälchen mit Hilfe von Tissue Tek eingebettet, sofort in -180°C gekühltem Isopentan tiefgefroren und bei -70°C gelagert.

Die Gefrierproben wurden mittels eines Cryotoms in 5 µm-Präparate bei -20° bis -30°C geschnitten, auf Super Frost[®] aufgebracht, 2 h bei Raumtemperatur getrocknet und in Gegenwart von Silica-trockengel eingeschweißt gelagert.

Für Paraffinschnitte wurden die Gewebe für 16-24 h in 20 ml frischem 4% Paraformaldehyd in PBS (w/v) fixiert. Danach wurden die Proben für mindestens 2 h unter fließendem Leitungswasser gewässert. Die Entwässerung und Paraffinierung erfolgte in der Abteilung von Prof. Dr. Gröne, DKFZ. Anschließend wurden die Proben in Paraffin eingegossen und bei Raumtemperatur archiviert. Paraffinschnitte, 5 µm dick, wurden mit Hilfe des Leica Microtoms angefertigt.

4.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) von Gewebeschnitten stellt eine Standardmethode in der Histologie dar. Bei dieser Färbetechnik werden basophile Zellkerne mit Hämatoxylin blau, eosinophile Strukturen wie das Cytoplasma, Kollagen oder Muskeln mit Eosin rosa bis rot gefärbt. Die HE-Färbung ist sowohl für Gefrier- als auch für Paraffinschnitte geeignet.

Die in Paraffin fixierten Gewebeschnitte wurden in einer Xylol/Ethanolreihe deparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte sequentiell zweimal 10 min in Xylol, zweimal 5 min in 100% Ethanol, zweimal 2 min in 96 und 70% Ethanol inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 2 min in Aqua bidest sowie 2 min in PBS gewaschen und für 3 min in Mayers Färbelösung überführt. Die Färbung wurde durch Waschen (1 min) unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Präparate 20 sek in HCL-Ethanol differenziert. Nach 10 min Wässern unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte eine Minute in 0,5% Eosin gefärbt. Danach erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe, d.h. je 2 mal 2 min in 70, 96 und 100% Ethanol. Nach 2 mal 5 min Waschen in Xylol wurden die Schnitte in Eukitt eingedeckt.

Die Gefrierschnitte wurden zunächst 5 min in 1% Paraformaldehyd fixiert und 10 min in PBS gewaschen. Die HE-Färbung erfolgte wie für Paraffinschnitte beschrieben.

4.4.3 Lipid-Färbung mit Oil Red O

Zur Sichtbarmachung von Lipiden wurden Kryostatschnitte von Rücken- und Schwanzhaut mit Oil Red O rot gefärbt (Romeis, 1989).

Dazu wurden die Schnitte 5 min in Formol-Calcium nach Baker (1% Paraformaldehyd in Calciumchlorid) fixiert und anschließend kurz in Aqua bidest gewaschen. Nach 5 min Inkubation in 60% Isopropanol wurden die Präparate 10 min in frisch filtrierter Oil Red O-Färbelösung gefärbt. Nach 20 sek Differenzieren in 60% Isopropanol wurden die Schnitte kurz in Aqua bidest gewaschen und die Zellkerne 2 min in Hämatoxylin blau gefärbt. Danach wurden die Präparate 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und in Glycerol (Dako, Hamburg) eingebettet.

4.4.4 Immunhistochemie

Zur Analyse der Expression bestimmter differenzierungs- und proliferations-assoziiierter in Geweben von K5-COX-2 transgenen und wt-NMRI-Mäusen wurden Kryostatschnitte angefertigt. Für die Immunfärbung von Kryostatschnitten wurden die bei -70°C gelagerten Objektträger auf Raumtemperatur gebracht, die Gewebeschnitte mit einem Papen-Fettstift umrandet und fixiert. Die Fixierungsmethode wurde für jedes nachzuweisende Antigen optimiert (s. Tabelle 2).

Anschließend wurden die Objektträger 10 min in PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte 10 min in frischen 3% Wasserstoffperoxid in Methanol inkubiert. Hieran schlossen sich 5 min Waschschrte in Aqua bidest und PBS an. Nach dem vollständigen Abklopfen der überschüssigen Waschflüssigkeit wurden die unspezifischen Bindungskapazitäten durch einstündige Inkubation in Blocklösung abgesättigt (Tab. 1). Nach dem Absaugen der Blocklösung erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Antikörper wurden in dem jeweiligen Blockreagenz verdünnt.

Die Gewebeschnitte wurden drei mal 10 min in PBS gewaschen, die überschüssige Waschflüssigkeit abgesaugt und die Schnitte mit Blockpuffer benetzt. Danach wurde der sekundäre Antikörper in Blockpuffer verdünnt auf die Schnitte aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

An die Antikörperinkubation schlossen sich drei 5 min Waschschrte in PBS an. Für die Substratreaktion mit Diaminobenzidin (DAB) wurden die Gewebeschnitte unter ständiger mikroskopischer Beobachtung 10 bis 90 min mit 100 µl DAB-Lösung pro Objektträger bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Substratlösung abgeklopft und die Schnitte 10 min gewässert. DAB-Abfälle wurden als Karzinogeabfall entsorgt.

Danach erfolgte eine Gegenfärbung des Gewebes mit Hämalaun. Zur Färbung der Zellkerne wurden die Objektträger exakt eine Minute in frisch filtrierte saures Hämalaun getaucht, anschließend 1 min unter fließendem Leitungswasser abgespült und danach zur Differenzierung 20 sek in sauren Ethanol überführt (0,5% HCl, 70% Ethanol, v/v).

Nach 10 min Spülen unter fließendem Leitungswasser wurden die Schnitte je 2 min in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80%, 90%, 96% und 100%) entwässert. Zur Vorbehandlung für das Eindecken in dem Xylol-haltigen Einbettungsmittel Eukitt wurden die Schnitte abschließend 5 min in Xylol inkubiert.

Tab. 2: Fixierungs- und Blocktechniken für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Antigen	Fixierung	Block	1. Ak	2. Ak	Methode
COX-1	1 % PFA	2,5 % MP	1:50	1:100	IHC
COX-2	1 % PFA	2,5 % MP	1:50	1:100	IHC
K5	Aceton (-20°C)	1% E-BSA/0,1% -Tw20	1:250	1:400	IF
K10	Me/Ac (1:1 v/v; 4°C)	1% E-BSA	1:100	1:200	IHC/IF
Inv	unfixiert	10 % Ziegen-Serum	1:800	1:400	IF
Loricrin	Aceton (-20°C)	1% E-BSA	1:25	1:100	IHC
Ki67	Me/Ac (1:1 v/v; 4°C)	1% E-BSA	1:50	1:100	IHC
CD 31	1 %PFA	1% E-BSA	1:50	1:100	IHC

Die Tabelle faßt für alle untersuchten Proteine die optimalen Anfärbetechniken zusammen. Die verwendeten Antikörper sind im Abschnitt 2. Material aufgelistet.

PFA Paraformaldehyd, Me Methanol, Ac Aceton, Inv Involucrin, E-BSA Elisa-BSA, MP Milchpulver, Tw20 Tween 20, ICH Immunhistochemie, IF Immunfluoreszenz

4.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenz-Färbung wurden ausschließlich Kryostatschnitte verwendet. Hierfür wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit Pap-Pen umkreist und fixiert. Je nach nachzuweisendem Antigen wurde die Fixierungsmethode variiert (Tab. 1). Danach wurden die Objektträger 10 min in PBS gewaschen. Vor der Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Schnitte für 30 min mit Blocklösung (Tab. 1) benetzt. Die Antikörper wurden in der jeweiligen Blocklösung verdünnt, die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C.

Nach dem 3 mal 5 min Waschen der Präparate in PBS wurden der sekundäre Antikörper in Blockierungsreagenz verdünnt auf die Schnitte aufgetragen. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für eine Stunde. Vor dem Eindecken mit Fluoreszenz Mounting-Medium wurden die Schnitte 3 mal 5 min im Dunkeln mit PBS sowie 1 min in Aqua bidest gewaschen.

Bis zur Auswertung der Färbung wurden die Präparate im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

4.5 Lipidanalytik

4.5.1 Lipidextraktion aus wässrigen Lösungen

1 ml Zellkulturüberstand wurde in ein Duranglas überführt. Der pH-Wert der Probe wurde mit 1N HCl auf 3,0 zur Protonierung der Carboxylatgruppen von Fettsäurederivaten eingestellt.

Nach Zugabe von 4 ml Ethylacetat wurden die organische und die wässrige Phase durch Vortexen für 30 sek gemischt. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 Upm in einer Beckmann-Zentrifuge für 5 min bei Raumtemperatur. Die obere organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und in ein Hecht-Assistent-Glas überführt. Anschließend wurde die Lipidextraktion mit 2 ml Ethylacetat wiederholt.

Die vereinigten organischen Phasen wurden durch eine Vakuum-Zentrifugation (Speedvac Vakuum Konzentrador) bis zur Trockne eingengt. Der die Lipide enthaltende Rückstand wurde in 750 µl absolutem Ethanol aufgenommen und für die anschließende Festphasenextraktion nach Powell mit 0,1 M Natriumformiat (pH 3,1) auf eine Endkonzentration von 15% Ethanol eingestellt. Die Proben wurden bis zum Auftragen auf die Silica-C₁₈-Säulen im Eisbad gekühlt.

4.5.2 Lipidextraktion aus Maushaut

Zur Bestimmung der Prostaglandinkonzentrationen in transgener und wildtyp Rücken- und Schwanzepidermis wurde die Haut nach Tötung der Tiere auf 3MM Whatmanpapier aufgezo-gen, auf einem -70°C Kühltisch tiefgefroren und bis zur Analyse bei -70°C gelagert.

Die Epidermis der Häute wurde bei -70°C mit einem sterilen Skalpell von der Dermis gekratzt. Diese kalt gekratzte Epidermis wurde in Stickstoff gekühlte Teflonkapseln überführt und mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert. Anschließend wurde das Pulver in 2 ml kalten absoluten Ethanol überführt und darin durch sorgfältiges Mischen vollständig suspendiert. Nach einer Zentrifugation (Beckman J2-21) bei 4°C, 4000 Upm, 20 min, wurde der klare ethanolische Überstand in ein Duran-Glasröhrchen überführt und durch Zugabe von 0,1 M Natriumformiat pH 3,1 auf 15% Ethanol eingestellt. Bis zum Auftragen auf die Silica-C₁₈-Säulen wurden die Proben auf Eis gekühlt.

Das Sediment der 4000 Upm-Zentrifugation wurde in 1 ml 8 M Harnstoff gelöst. Diese Lösung diente zur Quantifizierung Proteinkonzentration mittels des Biorad-Kit.

4.5.3 PGE₂-Extraktion aus Blutplasma

Die Extraktion von PGE₂ aus Thrombozyten-armem Plasma erfolgt mittels Affinitätschromatographie über PGE₂-Affinity-Säulen.

Dazu wurden 150 µl Plasma mit 600 µl Eicosanoid-Affinity Column-Puffer (EAC-Puffer) verdünnt und auf die Affinitätssäule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit je 10 ml EAC-Puffer und Wasser (HPLC-Qualität) wurde die Prostaglandin-Fraktion mit 95% Ethanol eluiert. Durch Vakuum-Zentrifugation wurden die Proben bis zur Trockne einrotiert und die Rückstände in 1 ml Enzym-Immuno-Assay(EIA)-Puffer aufgenommen und die PGE₂-Konzentration bestimmt.

Die Säulen wurden nach dem Elutionsschritt durch das Auftragen von je 10 ml Wasser (HPLC-Qualität) und EAC-Puffer regeneriert.

4.5.4 Festphasenextraktion nach Powell

Die nach 4.5.1 und 4.5.2. erhaltenen Lipidfraktionen wurden über 6 ml Silica-C₁₈-Glaskartuschen (1 ml Gelbett) durch Festphasenextraktion mit Hilfe der Adsorbex SPU Probenaufbereitungsstation aufgereinigt.

Die Silica-C₁₈-Säulen wurden zunächst mit 5 ml Ethylacetat gespült. Das Ethylacetat sowie alle anderen Lösungen wurden mit Hilfe eines Wasserstrahlvakuum (5 mBar) mit gleichmäßiger Durchflussgeschwindigkeit über die Säulen geleitet. Nach dem Spülen wurden die Säulen mit je 5 ml absolutem Ethanol und Aqua bidest äquilibriert. Die Proben wurden mit vermindertem Vakuum (0,5 mbar) langsam aufgetragen.

Dann wurden die Säulen mit je 5 ml 15% wässrigem Ethanol sowie Aqua bidest gewaschen. Anschließend wurde für 30 sek Luft durch die Säulen gezogen und danach mit 5 ml n-Hexan nachgewaschen. Die Elution der Prostaglandine erfolgte mit 5 ml Ethylacetat. Das Eluat wurde in einem Hecht-Assistent-Zentrifugenglas aufgefangen und durch Vakuum-Zentrifugation zur Trockne eingeeengt.

Die Rückstände wurden anschließend in 500 µl EIA-Puffer, einer Komponente des PGE₂/PGF_{2α} Kits, gelöst und bei -20°C gelagert.

4.5.5 Bestimmung der PGE₂/PGF_{2α}-Konzentrationen

Bei den zur Ermittlung der PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Konzentrationen verwendeten Immuno-Assay-Kits (Cayman Chemical) konkurrieren die PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Moleküle der Probe mit einer konstanten Menge von Acetylcholinesterase-konjugierten PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Molekülen (Tracer) um den zugesetzten anti-PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Antikörper und infolge um die Bindung an die mit polyklonalen Ziege-anti-Maus-Antiserum beschichteten Elisa-Platten. Als Substrat für die Acetylcholinesterase-Reaktion fungiert Ellmann's Reagenz. Das Reaktionsprodukt 5-Thio-2-nitrobenzoesäure besitzt ein Absorptionsmaximum bei 412 nm. Die gemessene optische Dichte bei dieser Wellenlänge ist der Konzentration an gebundenem Tracer proportional und damit umgekehrt proportional zur PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Konzentration der Probe.

Bei der Durchführung des Tests wurden pro Gefäß der Elisa-Platte je 50 µl Standardlösung (1000-7,8 pg bzw. 500-3,6 pg) bzw. 50 µl in EIA-Puffer verdünnte Probe, je 50 µl Tracer und monoklonaler Maus-anti-PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Antikörper gegeben und über Nacht (18 h) bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung von Tracer-Molekülen an die Elisa-Platte wurden anstatt Probe und PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Antiserum 100 µl EIA-Puffer mit 50 µl Tracer inkubiert. Die maximale Tracer-Bindung wurde im Inkubationsansatz B₀ bestehend aus 50 µl EIA-Puffer, 50 µl Tracer und 50 µl PGE₂ bzw. PGF_{2α}-Antiserum bestimmt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Flüssigkeit aus der Platte ausgeschlagen und die Platte 5 mal mit je 200 µl Waschpuffer pro Gefäß gewaschen. Zur Überprüfung der maximalen Acetylcholinesterase-Aktivität wurden in ein zuvor unbehandeltes Gefäß 5 µl Tracer pipettiert. Im Anschluß daran wurden in jedes Gefäß 200 µl frisch angesetztes Ellmann's Reagenz gegeben. Die Reaktion erfolgte im Dunkeln. Nach 30, 60 min sowie nach 2 und 3 h wurde die optische Dichte bei 405 nm im Elisa Reader gemessen. Als Nullwert-referenz diente ein lediglich mit 200 µl Ellmann's Reagenz gefülltes Gefäß.

Mit Hilfe der Eichkurve wurden die Proetinkonzentrationen ermittelt.

4.5.6 Bestimmung der 6-Keto-PGF_{1α}-Konzentration

Die Bestimmung der 6-Keto-PGF_{1α}-Konzentration erfolgte mit dem Correlate Enzyme Immuno-Assay, ein kompetitiver Immunoassay (siehe 3.7.5) zur Quantifizierung von 6-Keto-PGF_{1α} in biologischen Proben. Dazu wurden die durch Ethylacetat und anschließender Festphasenextraktion nach Powell isolierten Lipide in 50 µl Ethanol und 200 µl Assay-Puffer aufgenommen. Wurden die extrahierten Lipide nicht direkt im Enzym-Immuno-Assay analysiert, erfolgte die Lagerung in 4 ml Ethylacetat bei -70°C.

Zur Messung der 6-Keto-PGF_{1α}-Konzentration wurden 100 µl Probe bzw. 6-Keto-PGF_{1α}-Standards mit 50 µl alkalische Phosphatase konjugiertem 6-Keto-PGF_{1α} und 50 µl po-

lyklonalem Kaninchen anti-6-Keto-PGF_{1α}-Antikörper über Nacht (16 h) bei 4°C in mit anti-Kaninchen-IgG beschichteten Elisaplatten inkubiert. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindungskapazität wurden der 6-Keto-PGF_{1α}-Antikörper und das Probenvolumen durch Assay-Puffer ersetzt. Außerdem wurde die maximale Bindung durch Inkubation von 100 µl Assay-Puffer mit 50 µl 6-Keto-PGF_{1α}-Antikörper und 50 µl alkalische Phosphatase konjugiertem 6-Keto-PGF_{1α} bestimmt.

Nach dreimaligem Waschen der Platte mit Waschpuffer wurden 200 µl p-Npp-Substrat pro Gefäß pipettiert und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Substratreaktion wurde durch Zugabe von Stop-Lösung beendet und die optische Dichte im Elisa Reader bei 405 nm bestimmt.

4.6 Generierung und Zucht transgener Mäuse

4.6.1 Vorbereitung des Mikroinjektionskonstrukts

Zur Vorbereitung auf die Mikroinjektion wurde das K5-COX-2-Plasmid mit KpnI geschnitten, um die BlueScript-Vektorkomponenten zu entfernen. Das erhaltene 15 kB DNA-Fragment setzte sich aus dem bovinen K5-Promotor, der COX-2-cDNA und einer bovinen 3' Splice-Poly-A-Sequenz zusammen (Abb. 11). Dieses Konstrukt wurde aus einem 0,8% Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung extrahiert. Zum Abtrennen von Fremdpartikeln und toxischen Substanzen wurde die DNA-Lösung durch einen Mikrofilter (0,2 µ) sterilfiltriert, anschließend drei Stunden gegen Mikroinjektionspuffer dialysiert und auf eine DNA-Konzentration von 3 ng/µl eingestellt.

4.6.2 Mikroinjektion und Embryotransfer

Die Mikroinjektion des KpnI linearisierten DNA-Konstruktes in befruchtete NMRI-Oozyten und der anschließende Transfer in scheinschwangere Weibchen wurde zum einem durch Herrn U. Klotz (DKFZ, Heidelberg), zum anderen bei der RCC (Füllinsdorf, Schweiz) ausgeführt.

4.6.3 Zucht der transgenen Linien

Für die Zucht der transgenen Linien wurden die transgen getesteten Tiere der F₀-Generation mit wildtyp (wt) NMRI-Tieren verpaart. Transgene Elterntiere mit 50% heterozygot-transgener Nachkommen, sogenannte Founder, wurden für die Zucht transgener

Linien herangezogen. Die heterozygoten Tiere der F₁-Generation wurden ebenfalls mit Wildtyp-Tieren verpaart und aus dem Nachwuchs der F₂-Generation heterozygot-heterozygot Verpaarungen angesetzt. Dabei wurden Bruder-Schwester-Verpaarungen zur Minimierung von Inzuchteffekten vermieden.

Die Kontrolle auf Transgenität erfolgte mittels PCR-Analyse mit Transgen-spezifischen Primern. Die Identifizierung homozygoter Tiere erfolgte mittels Southern-Blot und anschließender Rückkreuzung der potentiell homozygoten Tiere mit NMRI-Wildtyp-Tieren.

4.6.4 Tierhaltung

Die Tierhaltung erfolgte unter einem künstlichen Tag- und Nachtrhythmus bei kontrollierter Temperatur von $21 \pm 1^\circ\text{C}$ und Luftfeuchtigkeit (50-60% relative Luftfeuchte). Jungtiere wurden 4 Wochen nach der Geburt von der Mutter getrennt. Je 4 Weibchen wurden in einem Makrolonkäfig des Typs II gehalten. Die Männchen wurden nach dem Absetzen von der Mutter separiert und einzeln gehalten.

4.7 Tierversuche

4.7.1 Gewinnung von Blutplasma

Die Blutentnahme bei narkotisierten Mäusen erfolgte retrobulbär mit 10 mM EDTA/10 μM Indomethacin benetzten Pasteurpipetten. Das gesammelte Blut wurde in 2 ml Hemo-grad Vacutainer überführt, in denen 5 μl einer 2 mM Indomethacin-Lösung vorgelegt worden waren.

Anschließend wurden die Proben zur Herstellung Thrombozyten-armen Plasmas 5 min bei 2500 Upm (Beckmann J2-21 Zentrifuge) zentrifugiert. Das Blutplasma wurde vorsichtig abgenommen, in Eppendorfgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die Tiere wurden anschließend durch zervikale Dislokation getötet.

4.7.2 Ohrödemtest

Im Ohrödemtest wurden 8 Wochen alte Tiere eingesetzt. Den Tieren wurden verschiedene Konzentrationen TPA (0,1-2 nmol/10 μl Aceton) und Arachidonsäure (33 nmol/10 μl Aceton) pro Ohr appliziert. Die Behandlungsdauer betrug 2-24 h.

Zur Quantifizierung der induzierten Ödemreaktion wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet, und Ohrstanzen von einem Durchmesser von 8 mm auf einer Feinwaage gewogen.

Alternativ wurde den Tieren 150 µl einer sterilfiltrierten 2% Evans-Blau Lösung in isotonischer Kochsalzlösung intravenös durch die Schwanzvene gespritzt und 30 min später der Austritt des blauen Farbstoffes ins Gewebe fotografiert.

Kontrolltiere wurden mit dem entsprechenden Volumen Acteon behandelt.

4.7.3 Messung der epikutanen Sebumkonzentration

Zur Messung der epikutanen Sebumkonzentration wurden die Mäuse in gesättigter CO₂-Atmosphäre getötet. Danach erfolgte die Messung mit dem Sebumeter SM 810. Der das Sebum adsorbierende Teststreifen wurde 30 sek auf der Haut platziert und danach die Sebumkonzentration photometrisch bestimmt. Die Sebumkonzentrationen der Nacken-, Rücken- und Schwanzhaut wurden quantifiziert. Die Messung auf behaarten Körperstellen wurde sowohl auf rasierter als auch unrasierter Haut durchgeführt.

4.7.4 Futterversuch mit selektiven COX-2-Inhibitoren

Zur Überprüfung des Zusammenhangs zwischen Keratin 5-Promotor gesteuerter COX-2-Überexpression und gesteigerter Prostaglandin-Synthese wurden Wildtyp-NMRI-Weibchen mit einem homozygoten Männchen der Linie 667 verpaart. Nach der Geburt der Jungtiere wurden die Muttertiere mit selektiven COX-2-Inhibitoren (Inh) gefüttert. Das mit den COX-2-Inhibitoren (SC-58635, Inh 1; SC-65872, Inh 2) supplementierte Futter wurde von K. Seibert, Pharmacia/Searle zur Verfügung gestellt. Die mit der Nagerdiät zugeführten Inhibitorkonzentrationen betrugen 1500 ppm für Inhibitor 1 und 500 ppm für Inhibitor 2. Nach dem Absetzen der Jungtiere im Alter von 4 Wochen wurden diese kontinuierlich mit dem supplementierten Futter aufgezogen. Parallel wurden je einer Gruppe Wildtyp- und transgener Tiere mit Kontrolldiät ernährt. Jede Versuchsgruppe umfaßte 3 Tiere. Die Analyse der Auswirkungen der Inhibitor-Diät erfolgte im Alter von 12 Wochen.

4.7.5 Chemisch induzierte Mehrstufenkarzinogenese der Maushaut

Die Induktion epidermaler Tumore erfolgt nach dem Initiation-Promotionsprotokoll der Maushautkarzinogenese (Fürstenberger und Kopp-Schneider, 1995). Alle Mäuse werden zu viert in Makrolonkäfigen vom Typ II, individualisiert durch Ohrmarkierung, bei kontrollierten Licht- Temperatur ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) und Feuchtigkeitsbedingungen (50-60% relative Luftfeuchtigkeit) gehalten. Futterpellets (Altromin, Lage) und Wasser stehen ad libitum zur Verfügung. 7 Tage vor Behandlung wird die Rückenhaut der Mäuse auf einer Fläche von 8 cm² rasiert. Für die Versuche werden nur Tiere in der Telogenphase des Haarzyklus

eingesetzt. TPA und DMBA werden in Aceton gelöst und in einem Volumen von 0,1 ml auf die rasiert Fläche der Rückenhaut aufgetragen.

Zur Initiation der Mehrstufenkarzinogenese erfolgte eine einmalige topische Behandlung der Tiere mit 100 nmol 7, 12-Dimethylbenz[a]anthrazen (DMBA) in 100 µl Aceton. Der Initiations-Kontrollgruppe wurden 100 µl Aceton epikutan appliziert. Je 20 Tiere bildeten dabei eine Versuchsgruppe.

Eine Woche danach wurde mit der mit der topischen Applikation des Tumorpromotors 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) begonnen. Die Behandlung erfolgte zwei mal wöchentlich für 30 Wochen mit je 5 bzw. 2,5 nmol TPA in 100 µl Aceton. Die Promotions-Kontrollgruppe wurde nach erfolgter DMBA-Initiation mit zweimal wöchentlich 100 µl Aceton behandelt.

Die Papillom-Inzidenz (Anzahl Papillome/Tier) und –Ausbeute (Anzahl Papillome/Tier) wurde über einen Zeitraum von 30 Wochen einmal pro Woche individuell für jede Maus dokumentiert.

5 Ergebnisse

Um die Funktion von COX-2 in normaler Haut und bei der epidermalen Tumorgenese verstehen zu lernen, wurden transgene Mauslinien generiert, die unter der Kontrolle des bovinen Keratin 5-Promotors COX-2 im basalen Kompartiment der Epidermis konstitutiv exprimierten.

Dafür wurde zunächst die Exprimierbarkeit der zur Verfügung stehenden COX-2-cDNA zu aktivem Protein getestet und das transgene K5-COX-2-cDNA-Konstrukt sowohl molekularbiologisch als auch funktionell im Rinderzellsystem überprüft. Erst danach wurde das Konstrukt für die Mikroinjektion in befruchtete Oozyten aufgereinigt.

Nach der Identifizierung der das K5-COX-2-Konstrukt als Keimbahnmutation tragenden Mäuse wurde die gewebsspezifische transgene Expression von aktiver COX-2 kontrolliert und die geeigneten Mauslinien zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Zum einen wurden homozygote Linien etabliert, zum anderen in heterozygoten Linien die In-vivo-Effekte einer basalen konstitutiven COX-2-Expression auf die epidermale Gewebsarchitektur, Proliferation und Differenzierung, sowie die Haarentwicklung analysiert. Im Ödemtest wurde die Auswirkungen der transgenen COX-2-Überexpression in gereizter und entzündeter Haut untersucht (Abb. 8).

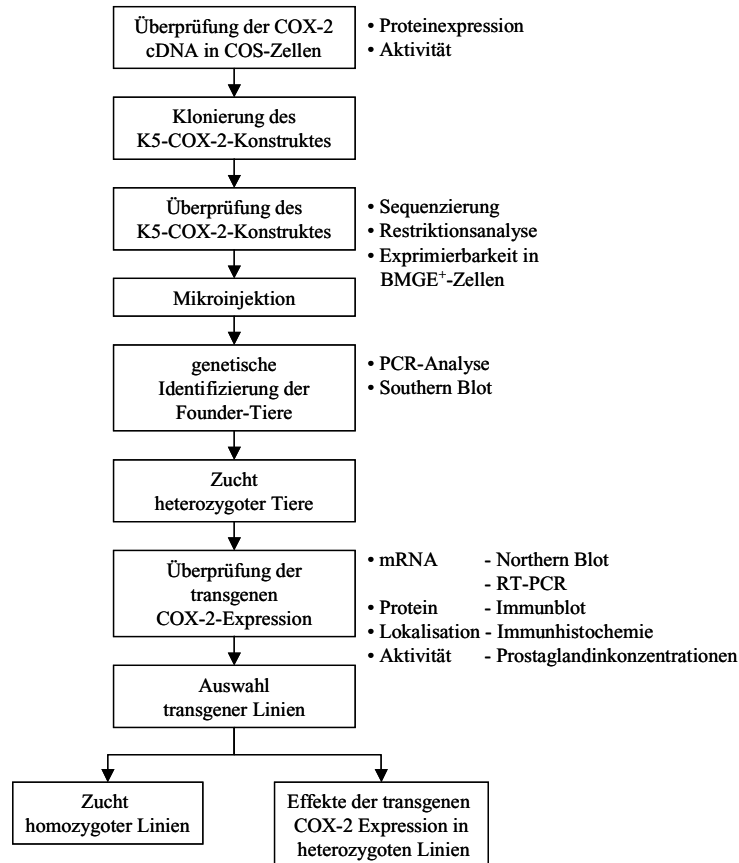


Abb. 8: Generierung und Charakterisierung transgener Mauslinien: von der DNA zur transgenen Maus

5.1 Das Keratin 5-Promotor-COX-2-Konstrukt

Für die gerichtete Überexpression von Proteinen in der Epidermis werden als regulatorische Sequenzen bevorzugt die Promotoren der von Keratinozyten differenzierungsspezifisch exprimierten Strukturproteine eingesetzt. Der Promotor des Zytokeratin 5-Gens (Keratin 5, K 5) steuert die Expression des Transgens im basalen Epidermiskompartiment. Dazu zählen neben dem Stratum basale die äußere Wurzelscheide des Haarfollikels und die Basalzellen des Talgdrüsenepithels. Außerdem exprimieren alle stratifizierenden Epithelien wie Zunge, Vormagen oder Ösophagus basal Keratin 5.

Zur Generierung der Keratin 5-COX-2 transgenen Mäuse wurde ein DNA-Konstrukt hergestellt, in dem die Maus-COX-2-cDNA zwischen den bovinen Keratin 5-Promotor und einer Splice-Poly-A-3'-UTR-Sequenz positioniert wurde. Zur effizienten Expression des transgenen Konstruktes im eukaryontischen System sind Polyadenylierungssequenzen zur Stabilisierung und Ausschleusung der mRNA aus dem Zellkern und das Vorhandensein von Splice- und Intronsequenzen von großer Bedeutung.

Das in dieser Arbeit verwendete transgene Konstrukt setzt sich aus zwei DNA-Komponenten zusammen. Das von M. Blessing (Universität Mainz) zur Verfügung gestellte Promotor-Konstrukt (Plasmid 81) enthielt in einem modifizierten Blueskript-Vektor (3,0 kb, Ampicillinresistenz, fl-Replikationsstartpunkt) den bovinen K5-Promotor (5,12 kb) und ovine 3' untranslatierte Splice-Poly-A-Sequenzen (1,85 kb). Die full-length Maus-COX-2-cDNA, von D.L. DeWitt (Michigan State University, East Lansing, USA) zur Verfügung gestellt, enthielt keine untranslatierte Sequenz (Plasmid 32).

5.1.1 Überprüfung der Maus-COX-2-cDNA

Zuerst wurde die Funktionalität der Maus-COX-2-cDNA überprüft. Um deren kodierende Eigenschaften in eukaryontischen Zellen kontrollieren zu können, wurde sie zunächst in den einen CMV-Promotor tragenden Expressionsvektor pcDNA3 (Plasmid 32) kloniert.

Dafür wurde die Maus-COX-2-cDNA (1,9 kb) mit der Restriktionsendonuklease SalI aus dem Plasmid 1132 geschnitten. Der pcDNA3-Vektor wurde durch XhoI-Restriktionsverdau linearisiert und mit alkalischer Phosphatase 5'-dephosphoryliert. Die danach elektrophoretisch aufgetrennten und durch Gelextraktion aufgereinigten DNA-Fragmente wurden über Nacht bei 16 °C ligiert. Mit dem Ligationsprodukt wurden Sure II-Bakterien transformiert und aus ihnen die Plasmid-DNA isoliert. Die Kontrolle des Konstruktes erfolgte durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung der Vektor-cDNA-Übergänge.

Die Expression eines enzymatisch aktiven COX-2-Proteins wurde in COS7-Zellen analysiert. Mittels der Calciumphosphatmethode wurden die Zellen transient mit dem COX-2-pcDNA3-Plasmid transfiziert. Durch Immunpräzipitation und anschließende Immunblot-Analyse mit COX-2-spezifischen Antikörpern gelang es, COX-2-Protein in COX-2-pcDNA3-transfizierten Zellen nachzuweisen, erkennbar an der für COX-2-Protein charakteristischen Doppelbande bei 72 bzw. 74 kD (Abb. 9 A). Weder in untransfizierten COS7-Mutterzellen noch in transient mit der Vektorkontrolle transfizierten COS7-Zellen war COX-2-Protein mit dieser Methode detektierbar.

Außerdem wurde die Aktivität der eingebrachten COX-2 durch Messung der PGE₂-Konzentration im Zellkulturmedium bestimmt. Dazu wurden die Lipide aus 1 ml Kulturmedium extrahiert, die Prostaglandine angereichert und PGE₂ mittels Enzym-Immun-Essay quantifiziert. Die Transfektion von COS7-Zellen mit dem COX-2-pcDNA3-Konstrukt führte im Vergleich zur untransfizierten COS7-Mutterzelle und zu pcDNA3-transfizierten Zellen zu einem ca. 5-fachen Anstieg der PGE₂-Konzentration im Kulturmedium (Abb. 9 B).

Damit war sichergestellt, daß die zur Herstellung des Keratin 5-Promotor-COX-2-Konstruktes einzusetzende Maus-COX-2-cDNA für ein in eukaryontischen Zellen aktives COX-2-Protein kodiert.

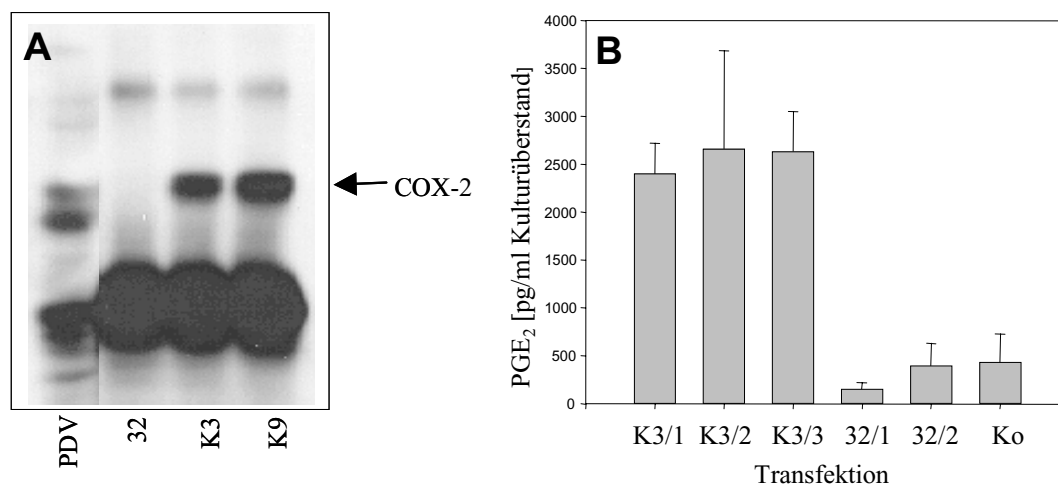


Abb. 9: Transiente Transfektion von COX-2-cDNA in COS7-Zellen

(A) Immunblot: Aus Zellysat wurde COX-2-Protein durch Immunpräzipitation mit einem isoenzymspezifischen Antikörper (Hase 82) angereichert und nach Polyacrylamidgelelektrophorese im Immunblot mit dem gleichen Antikörper detektiert.

PDV: COX-2-Positivkontrolle aus PDV-Keratinocyten, die beide COX-Isoenzyme exprimieren (Strickland et al. 1988); 32: pcDNA3-; K3 und K9: Maus-COX-2-cDNA-pcDNA3-Transfektanten

(B) PGE₂-Konzentrationen im Kulturüberstand: Nach Ethylacetatextraktion der Lipide aus Kulturüberstand der COS-7-Kulturen wurden die Prostaglandine durch Festphasenextraktion nach Powell angereichert und PGE₂ im Enzym-Immun-Assay quantifiziert.

K3/1-K3/3: Maus-COX-2-cDNA-pcDNA3-Transfektanten; 32/1, 32/2: pcDNA3-Transfektanten; Ko: untransfizierte COS7-Zellen.

5.1.2 Klonierung und Überprüfung des K5-COX-2-Konstruktes

Zur Klonierung des Plasmides 1135 wurde die 1,92 kb große COX-2-cDNA mit der Restriktionsendonuklease SalI aus dem Plasmid 1132 geschnitten, elektrophoretisch im Agarosegel von den Vektorkomponenten abgetrennt, aus dem Gel extrahiert und in den mit SalI/XhoI linearisierten, 5'-dephosphorylierten Keratin 5-Expressionsvektor (Plasmid 81) ligiert. Mit dem Ligationsprodukt wurden SureII-Bakterien transformiert und aus ihnen DNA extrahiert (Abb. 10).

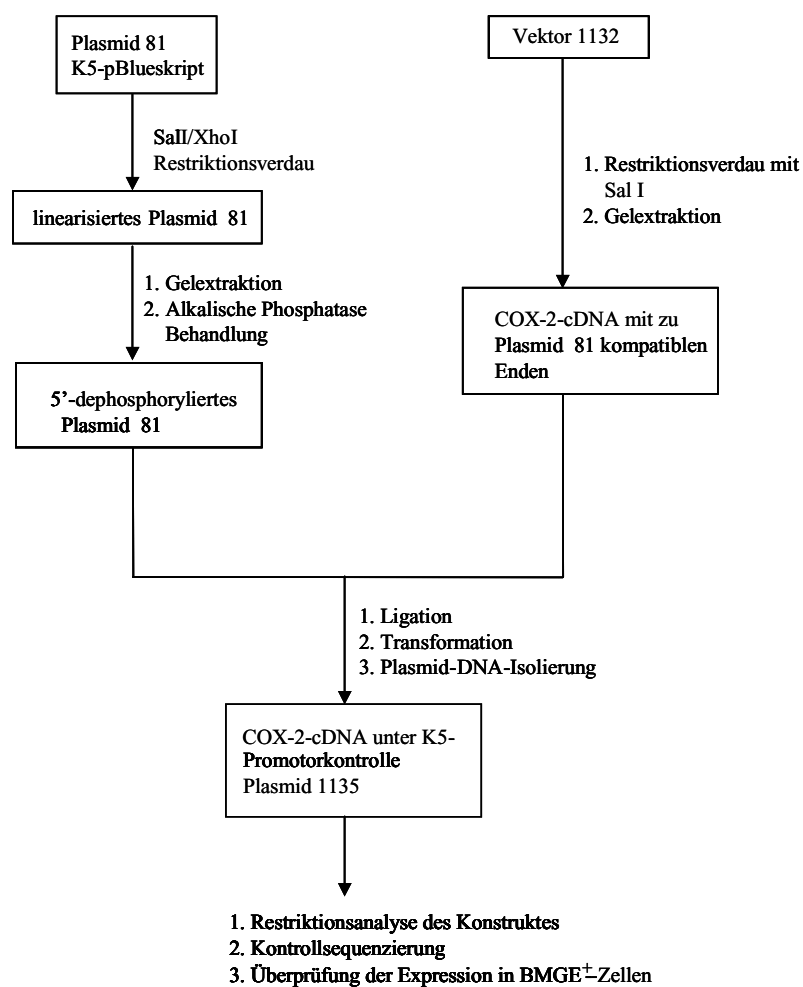


Abb. 10: Klonierungsschema des Plasmides 1135

Die 3' UTR-freie cDNA der Maus COX-2 wurde mit SalI aus dem Vektor 1132 ausgeschnitten. Das den bovinen Keratin 5-Promotor sowie die Splice- und Polyadenylierungssequenzen tragende Plasmid 81 wurde mit den Restriktionsendonukleasen SalI und XhoI linearisiert und mit alkalischer Phosphatase 5' dephosphoryliert. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden nach Aufreinigung ligiert, das Ligationsprodukt, Plasmid 1135, in SureII-Bakterien transferiert und die Plasmid 1135-DNA aus der Bakterienkultur isoliert. Die Kontrolle des Plasmids 1135 erfolgte durch Restriktionsanalyse, Sequenzierung und stabile Transfektion in Rinderzellen (BMGE⁺).

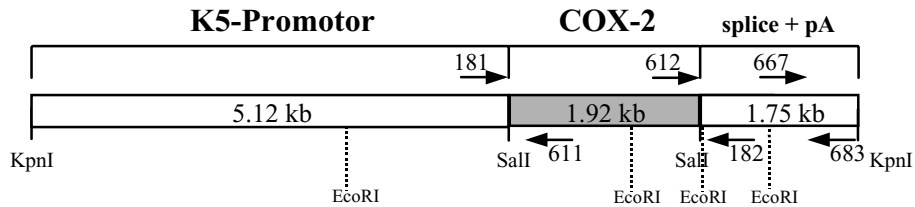


Abb. 11: Keratin 5-COX-2-Konstrukt

Als Vorbereitung für die Mikroinjektion in Mausoozyten wurde das Plasmid 1135 zunächst mit dem Restriktionsenzym KpnI verdaut und das K5-COX-2-Konstrukt bestehend aus der 5,12 kb großen bovinen K 5-Promotor-, der 1,92 kb großen Maus COX-2-cDNA- und der 1,75 kb großen 3'UTR-Sequenz, extrahiert, charakterisiert und aufgereinigt. Die 3' UTR-Sequenz setzt sich aus einem Polyadenylierungssignal sowie aus dem Intron II des β -Globin Gens zusammen. Die Positionen der zur Charakterisierung und Identifizierung eingesetzten Primerpaare (181/611, 182/612, 667/683) sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Lokalisation der Konsensussequenzen der verwendeten Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

Das sogenannte Plasmid 1135 wurde anschließend im Bakteriensystem vermehrt, aufgereinigt und mit KpnI verdaut. Das insgesamt 8,9 kb große, den K5-Promotor, Maus-COX-2-cDNA und 3'UTR-Sequenzen umfassende Fragment (Abb. 11) wurde mittels Agarosegelelektrophorese und anschließender Gelextraktion aufgereinigt und mit den Restriktionsendonukleasen ClaI, BamHI und XhoI geschnitten. Die Größen der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente stimmten mit den aus den Vektorkarten errechneten überein und ließen auf die korrekte Insertion der Maus-COX-2-cDNA im Keratin-5-Expressionsvektor schließen (Abb. 12).

Zusätzlich wurden die Promotor-cDNA bzw. cDNA-3'UTR-Übergänge und die komplette Maus-COX-2-cDNA mehrmals mittels spezifischer Primer (181, 183, 601-612) sequenziert und die ermittelte Basenabfolge mit der Datenbanksequenz (AC: M64291) verglichen. Dabei wurden 3 abweichende Basen in der klonierten COX-2-cDNA-Sequenz festgestellt, nämlich N292/293 CT \rightarrow TC und N1427 A \rightarrow G.

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um inaktivierende Punktmutationen handelte, wurde die im Plasmid 1132 enthaltene COX-2-cDNA vollständig sequenziert. Auch hier unterschieden sich die zwei Basenpaare von der veröffentlichten Sequenz.

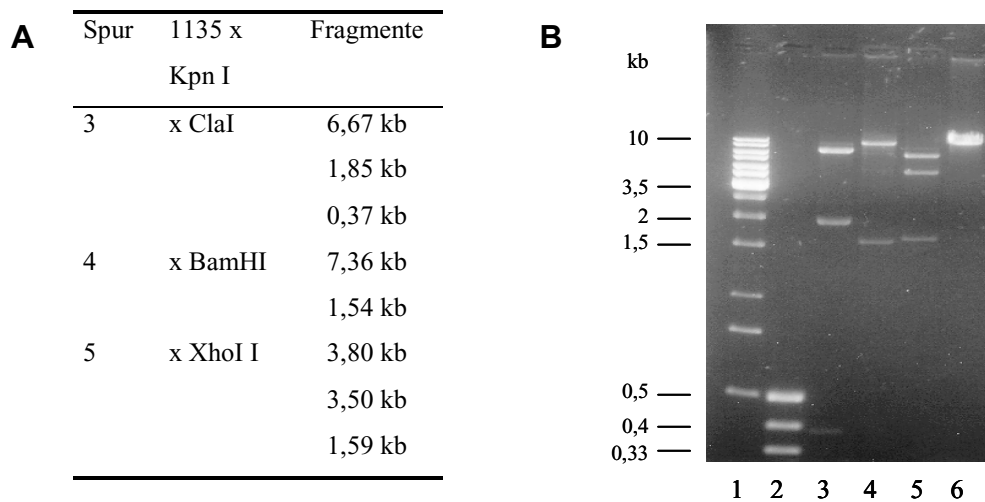


Abb. 12: Restriktionsanalyse des K5-COX-2-Konstruktes

Es wurden 600 ng 1135 x KpnI gemäß den Herstellerangaben mit den genannten Restriktionsendonukleasen umgesetzt und die entstandenen DNA-Fragmente im Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert.

(A) Tabellarische Übersicht der zu erwartenden DNA-Fragmente

(B) Agarosegel. Spur 1: 1kb-Größenmarker; Spur 2: pUC-Größenmarker; Spuren 3-5: ClaI-, BamHI-, XhoI-Verdau des 1135 x KpnI-Fragmentes; Spur 6 1135 x KpnI-Fragment

5.1.3 Expression des K5-COX-2-Konstrukts in BMGE⁺-Zellen

Die Promotoraktivität und damit die Exprimierbarkeit des K5-COX-2-Konstrukts wurde in der Rinderzelllinie BMGE⁺ überprüft. Das Plasmid wurde durch Poly-Ornithin-Transfektion in die Zellen eingebracht. Anschließend wurden stabil transfizierte Zellklone durch G418-Behandlung selektioniert und kultiviert. Durch Northern-Blot-Analyse mit einer radioaktiv markierten COX-2-spezifischen Sonde und RT-PCR mit transgenspezifischen Primern wurde die mRNA-Expression des Transgens analysiert.

Wie aus Abbildung 13 hervorgeht, war es mit beiden Methoden möglich, Keratin 5-Promotor-gesteuerte COX-2-mRNA-Expression nachzuweisen.

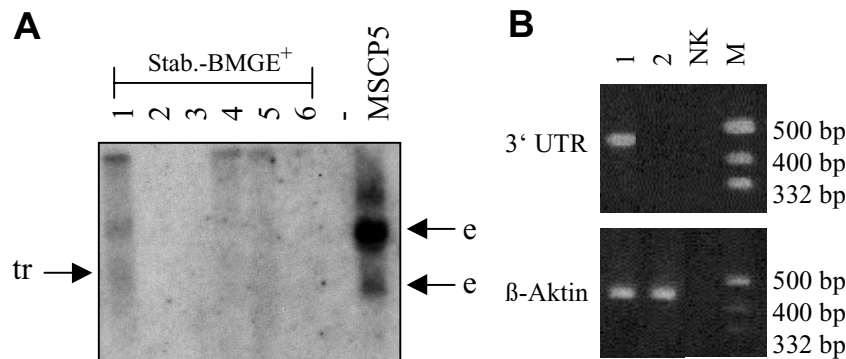


Abb. 13: Expression des K5-COX-2-Konstruktes in stabil transfizierten BMGE⁺-Zellen

Aus den Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert und die transgene mRNA im (A) Northern Blot mit einer ³²P-markierten COX-2-cDNA-Sonde und (B) mittels RT-PCR mit transgen spezifischen 3' UTR-Primern (667/683) nachgewiesen. 1 µg RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR erfolgte mit dem transgenspezifischen 3' UTR-Primerpaar 667/683 (cDNA: 460 bp; genomische DNA: 926 bp). Zur Kontrolle der Reversen Transkriptase-Reaktion wurde eine 429 bp Sequenz der Maus-β-Aktin-cDNA mit dem Primerpaar 24/25 amplifiziert. Gesamt-RNA von MSCP5-Keratinocyten, die COX-2 konstitutiv exprimieren, wurde als Positivkontrolle eingesetzt.

e, endogene COX-2-mRNA; tr transgene COX-2-mRNA; NK Negativkontrolle, 1-6 Stabil transfizierte BMGE⁺-Kulturen

Die 3,4 kb große Bande der transgenspezifischen COX-2-mRNA wurde durch Hybridisierung in den stabilen BMGE⁺-Kulturen 1, 3 und 4 sichtbar. Als Positivkontrolle diente Gesamt-RNA aus MSCP5-Keratinocyten, die COX-2 konstitutiv exprimieren. In dieser Spur waren die typischen 4,4 und 2,8 kb Banden des endogenen COX-2-Gen-Transkriptes zu erkennen.

Mit dem Primerpaar 667/683, das zu Sequenzen des 3' UTR-Bereiches des transgenen Konstrukts komplementär ist, wurde mittels RT-PCR zusätzlich ein DNA-Fragment von 460 bp Größe im Agarosegel identifiziert (Abb. 13 B), das der berechneten Größe entsprach. Eine Amplifikation der genomischen Sequenz hätte ein 929 bp großes PCR-Fragment ergeben. Dieses war im Agarosegel nicht sichtbar.

5.2 Generierung K5-COX-2-transgener Mäuse

5.2.1 Identifizierung der Founder-Tiere

Die Mikroinjektion von DNA in Oozyten, die am häufigsten eingesetzte Technik zum Einbringen von Fremd-DNA in das Mausgenom, wurde zur Herstellung transgener Tiere genutzt. Dafür wurden hormonell superovulierten NMRI-Spenderweibchen (Auszuchtstamm) die befruchteten Oozyten im Einzellstadium entnommen und aufgereinigtes, KpnI-linearisiertes K5-COX-2-Konstrukt in einen der beiden Vorkerne injiziert. Entsprechend wurde auch mit den Oozyten des Hybridstammes B6D2F1 verfahren. Dieser Vorgang und der anschließende Transfer der manipulierten Oozyten in die Ampulle des Eileiters schein-schwangerer NMRI- bzw. B6D2F1-Weibchen wurde am DKFZ durch Herrn Uli Klotz und bei der Firma RCC, Füllinsdorf (Schweiz) durchgeführt. Insgesamt wurden 91 NMRI- und 16 B6D2F1-Jungtiere geboren (Abb. 14).

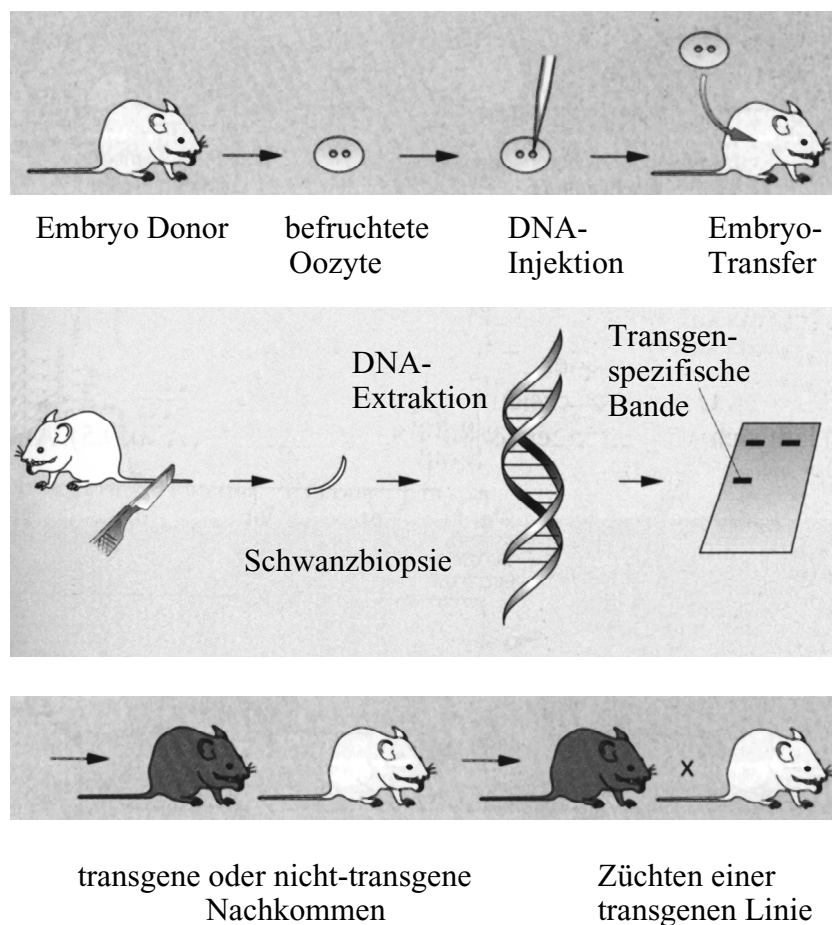


Abb. 14: Generierung transgener Mäuse durch Mikroinjektion

Aus Schenkel, 1995, Transgene Tiere, Spektrum-Akademischer Verlag

Zur Identifizierung der transgenen Tiere wurde zunächst genomische DNA aus Schwanzbiopsien 4 Wochen alter Mäuse isoliert. Mit zwei transgenspezifischen Primerpaaren (181/6121 und 612/182), die komplementär zu COX-2-cDNA-Sequenzen (611, 612) bzw. K5-Promotor- (181) und 3' UTR-Sequenzen (182) des K5-COX-2-Fragmentes waren, wurde die PCR-Analyse durchgeführt (Abb. 15 A).

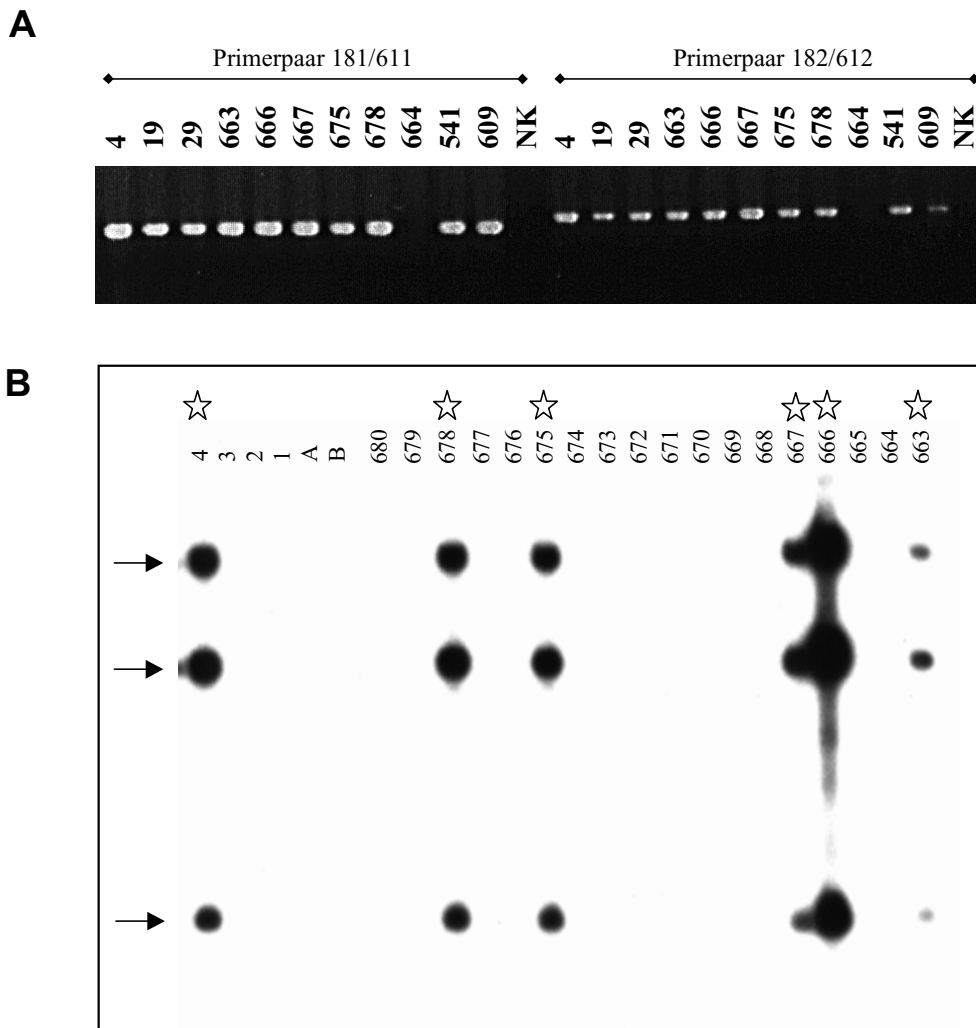


Abb. 15: Identifizierung der K5-COX-2 Founder-Tiere

Die genomische DNA wurde aus Schwanzbiopsien 4 Wochen alter Mäuse isoliert (Tiere 1-4, A, B, 663-680) (A) Je 0,25 µg genomische DNA wurde in der PCR mit den transgenspezifischen Primerpaaren 181/611 und 182/612 getestet. Der Nachweis der amplifizierten Fragmente erfolgte nach Elektrophorese im 1% Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung. NK, Negativkontrolle ohne DNA

(B) Je 2,5 µg genomische DNA wurden über Nacht mit EcoRI verdaut und die Fragmente im 0,8% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nylonmembran wurden die COX-2-Fragmente mit einer ³²P-markierten COX-2-cDNA-Sonde nachgewiesen.

→ transgenspezifische Bande, ☆ transgene Tiere

Die Amplifikation der genomischen DNA ergab für transgene Tiere die erwarteten DNA-Fragmente von 332 bzw. 279 bp Länge, wohingegen keine Amplikon-DNA bei nicht-transgenen Tieren (z.B. 664) auftrat. Bestätigt wurde die Integration des transgenen Konstrukts in die genomische DNA im Southern Blot-Verfahren, wobei EcoRI verdaute DNA aus Schwanzbiopsien mit radioaktiv markierter COX-2-cDNA-Sonde hybridisiert wurde. Auch hier wurde bei allen PCR-positiv getesteten Tieren das erwartete Fragmentmuster des K5-COX-2-Konstrukts gefunden, das in der genomischen DNA von Wildtyp-Tieren fehlte (Abb. 15 B). Der Anteil an transgenen Jungtieren lag je nach Stamm und Experimentator zwischen 10 und 30% (Tab. 3).

Tab. 3: Herstellung transgener Mäuse (Details s. Text)

Stamm	Ort	Jungtiere		Verhältnis ♂/♀	Founder-Tiere [%]	Linien
		Gesamtzahl	Transgen			
NMRI	RCC	58	6	2 / 4	10,3	19, 29
	DKFZ	34	7	6 / 1	20,6	663, 667, 675, 678, 4
B6D2F1	DKFZ	16	5	2 / 3	31,2	541, 609

Als nächstes wurde festgestellt, ob die mikroinjizierte DNA, außer in somatischen Zellen auch in Keimbahnzellen stabil eingebaut war. Entsprechend den Mendelschen Regeln sollte nach Verpaarung der somatisch transgen-getesteten Tiere mit Wildtyp-Mäusen ungefähr die Hälfte der Nachkommen transgen sein. Die Identifizierung transgener Tiere erfolgte wieder mittels PCR- und Southern-Blot-Analyse.

Insgesamt 7 transgene NMRI- und 2 B6D2F1-Mäuse mit nachgewiesener Keimbahnintegration des Transgens wurden als Founder-Tiere (F₀-Generation) zur Begründung der transgenen NMRI- (4, 19, 29, 663, 667, 675 und 678) und B6D2F1- (541, 609) Mauslinien ausgewählt. Die Herstellung der transgenen Mäuse ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

5.2.2 Zucht von heterozygot transgenen Linien

Die Zucht und Analyse der transgenen NMRI-Linien stand im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund. Die Linien 4, 663, 667, 675 und 678 wurden am DKFZ, die Linien 19 und 29 bei RCC gezüchtet.

Die Founder-Tiere (F_0 -Generation) wurden zunächst mehrmals mit Wildtyp-Tieren verpaart, um ausreichend Nachkommen für eine Auszucht und Charakterisierung zu erhalten. Aus Raumgründen war ein Barrierenwechsel im Zentralen Tierlabor des DKFZ notwendig. Deshalb wurde die F_1 -Generation der Linien 663, 667, 675 und 678 durch Embryotransfer generiert.

Tab. 4: Zucht heterozygoter transgener Linien

Linie	Tiere ¹	♂		♀		Transgene ²		Tr ♂	Tr ♀
4	170	96	56%	74	44%	82	48%	46%	51%
19	102	53	52%	49	48%	47	46%	43%	49%
29	98	54	55%	44	45%	52	53%	52%	35%
663	132	53	40%	69	60%	50	38%	51%	33%
667	66	35	53%	31	47%	40	61%	68%	58%
675	150	87	58%	63	42%	64	43%	47%	37%
678	86	55	64%	31	36%	25	30%	33%	23%

(1) Summe der in der F_1 - und F_2 -Generation geborenen Tiere, (2) transgene Nachkommen in F_1 und F_2

Anders als für eine Keimbahnintegration erwartet, waren nur 30% statt 50% der Nachkommen des Founders 678 positiv für das transgene Konstrukt. Die Zucht dieser Linie wurde daher nach der F_2 -Generation eingestellt (Tab. 4). Bei allen anderen Linien lag die Ausbeute an transgenen Nachkommen, wie bei einer Verpaarung mit Wildtyp-Tieren statistisch erwartet, zwischen 38 und 61% (Tab. 4). Auch das Verhältnis von weiblichen zu männlichen Nachkommen wich nicht signifikant vom erwarteten 50%-Wert ab.

Die Keimbahnintegration des K5-COX-2-Konstrukts und die Expression des Transgens hatten keinen Einfluß auf die Fertilität der heterozygot transgenen Tiere aller Linien. Die mittlere Wurfgröße wich nicht von den Werten für Wildtyp-Mäuse ab.

Bis auf Linie 663 bei der die Tiere im Alter von 6-10 Monaten verstarben, wurde keine Einschränkung der Lebensdauer bei den heterozygot transgenen Linien festgestellt.

5.2.3 Zucht homozygoter Tiere

Die Linien 19 und 29 (schwach COX-2 überexprimierend) und die Linien 667 und 675 als (stark COX-2 überexprimierend) wurden zur Zucht homozygoter Linien ausgewählt (s. 5.3.2.).

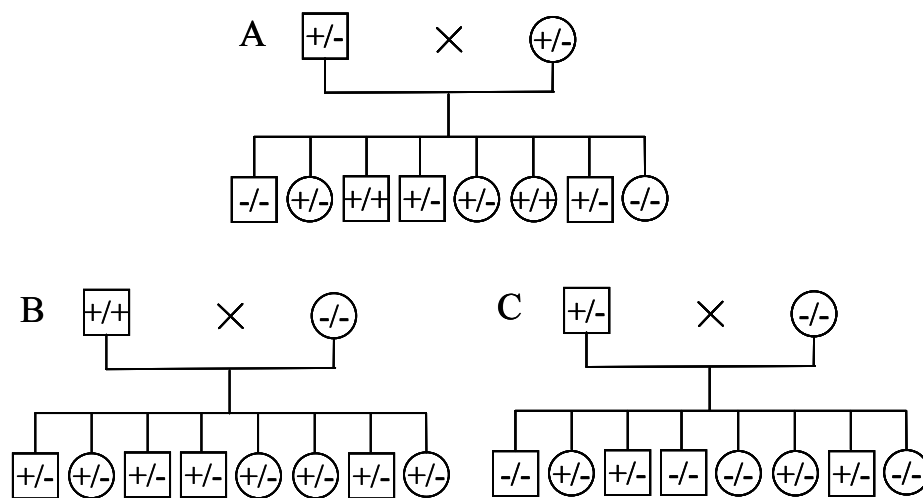


Abb. 16: Theoretische Kreuzungsschemata

(A) Homozygotieverpaarung zweier heterozygoter Tiere und deren Nachkommen (□ Weibchen, □ Männchen). 25% der Nachkommen sind homozygot, 50% heterozygot und 25% Wildtyp. Bei einer autosomalen Integration ist die statistische Verteilung zwischen männlichen und weiblichen Nachkommen jeweils 50%. Dies gilt auch für die Kreuzung eines homozygoten (B) oder heterozygoten (C) Tieres mit einem Wildtyp-Tier. (B) Alle Nachkommen sind heterozygot für die transgene Insertion. (C) Die Tochtergeneration setzt sich statistisch aus 50% heterozygoten und 50% Wildtyp-Tieren zusammen.

Zu diesem Zweck wurden heterozygote Tiere aus der F₂-Generation miteinander verpaart. Die 5 Zuchtpaare pro Linie stammten von verschiedenen Elterntieren ab, d.h. es wurden ausschließlich „Cousins mit Cousinen“ verpaart, um Inzuchteffekte zu minimieren. Da die Transgen- und Wildtyp-Gameten hierbei gleich häufig auftreten, war bei den Nachkommen dieser Verpaarung mit einer Aufspaltung der Genotypen wie folgt zu rechnen: homozygot (+/+) : heterozygot (+/-) : Wildtyp (-/-) wie 1:2:1 (Abb. 16 A).

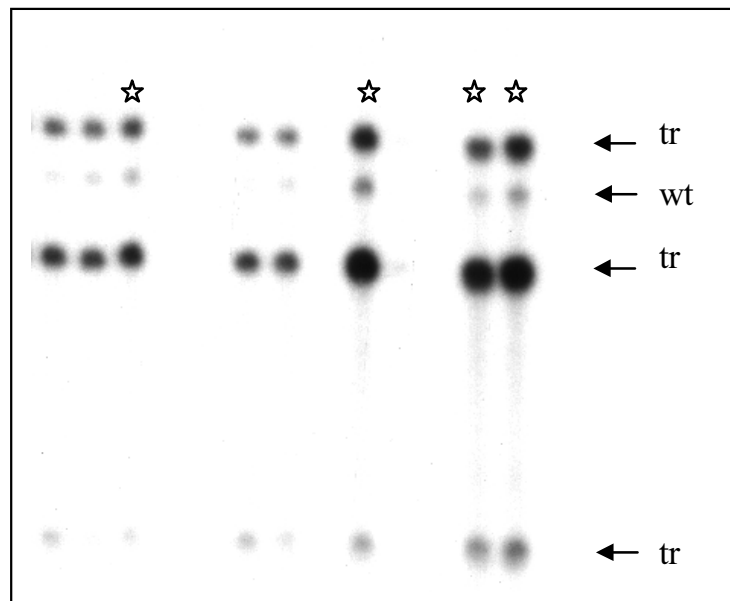


Abb. 17: Unterscheidung homozygot transgener von heterozygot transgenen Mäusen durch Southern-Blot-Analyse

2,5 µg genomische DNA wurden über Nacht mit EcoRI verdaut und durch Elektrophorese im 0,8% Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Southern Blot-Transfer auf eine Nylonmembran wurden die zur COX-2-Sequenz komplementären DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten COX-2-cDNA-Sonde und anschließender Exposition eines Röntgenfilms detektiert.

Die für das Wildtyp-COX-2-Gen spezifischen Banden (wt) sowie die für das Transgen (tr) spezifischen Banden sind mit Pfeilen markiert. Potentiell homozygote Tiere sind mit ☆ gekennzeichnet.

Zur Analyse des Genotyps der Nachkommen wurde genomische DNA aus Schwanzbiopsien der 4-6 Wochen alten Tiere isoliert. Die EcoRI-verdaute DNA wurde mittels Southern-Blot-Analyse unter Verwendung einer ^{32}P -markierten COX-2-cDNA Sonde analysiert. Die DNA homozygot transgener Tiere sollte im Autoradiogramm doppelt so intensive transgenspezifische Signale liefern wie die DNA heterozygoter Tiere. Nach Abbildung 17, die exemplarisch das Ergebnis einer Analyse von Tieren der Linie 667 darstellt, wurden die mit Stern gekennzeichneten Tiere als potentiell homozygot beurteilt. Zur Überprüfung ihrer Homozygotie wurden diese Tiere mit Wildtyp-NMRI-Mäusen rückgekreuzt. Homozygote Tiere würden dabei ausschließlich heterozygoten Nachwuchs zeugen (Abb. 16 B). Sind dagegen Wildtyp-Genotypen unter den Nachkömmlingen, so war das Elterntier nicht homo-, sondern heterozygot (Abb. 16 C). Die genetische Charakterisierung erfolgte erneut mittels PCR. Wie aus Abbildung 18, einer repräsentativen PCR-Analyse, hervorgeht, waren alle 15 Jungen des Tiers B heterozygot, das Tier B selbst also homozygot. Hingegen war nur bei 5 von 13 Jungen des Tieres A die transgene DNA nachweisbar. Das

Tier A war also heterozygot und nicht, wie nach Southern-Blot-Analyse vermutet, homozygot.

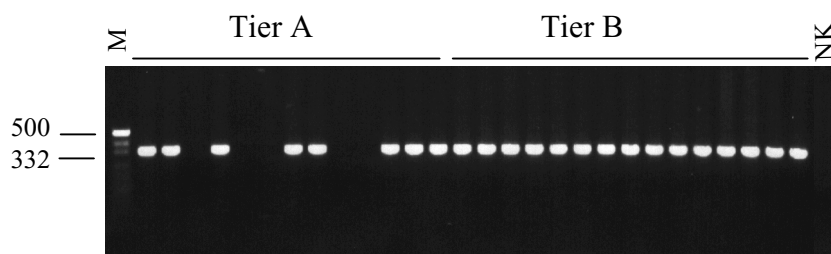


Abb. 18: Rückkreuzung potentiell homozygoter Tiere mit Wildtyp-Tieren - Nachweis des Transgens in genomischer DNA mittels PCR-Analyse

Genomische DNA aus Schwanzbiopsien von Nachkommen der Verpaarung zweier potentiell homozygoter Tiere der Linie 667 mit NMRI-Wildtyp-Partnern wurde mit dem Primerpaar 181/611 in der PCR analysiert. Das zu erwartende PCR-Fragment von 332 bp wurde nach Elektrophorese im ethidiumbromidhaltigen Agarsegel unter UV-Licht detektiert.

M, pUC-DNA-Größenstandard in bp, NK, Negativkontrolle

Die vorläufigen Zuchtergebnisse sind in Tabelle 5 zu sehen. Die Ausbeute an homozygoten Tieren lag mit 4-11% deutlich unter der errechneten Quote von 25%. Dieses mag zum einen auf die Ungenauigkeit des Auswahlverfahrens, zum anderen auf einen Selektionsnachteil homozygoter Tiere zurückzuführen sein.

Tab. 5: Zucht homozygoter K5-COX-2 transgener Tiere

Linie	getestete Tiere ¹	Potentiell +/+ ²	+/+ ³	% +/+ ⁴
19	83	20	9	10,8
667	56	9	3	5,4
675	123	17	5	4,0

(1) Anzahl der aus (+/-)x(+/-) erhaltenen Tiere, (2) Anzahl der nach Southern-Blot-Analyse als homozygot eingestuft Tiere, die mit Wildtyp-Tieren rückgekreuzt wurden, (3) Anzahl der tatsächlich homozygoten Tiere nach Rückkreuzung, (4) prozentualer Anteil der homozygoten Tiere bezogen auf die Zahl ursprünglich getesteter Tiere (1).

5.3 Charakterisierung der K5-COX-2-transgenen Mäuse

Die Integration von Fremd-DNA in das Mausgenom erfolgt zufällig und ist nicht gleichbedeutend mit der Expression der kodierenden Sequenz. Um zu klären, ob das Transgen exprimiert wird, wurden verschiedene Gewebe von transgenen Tieren auf die Anwesenheit von transgenspezifischer RNA und COX-2-Protein analysiert.

5.3.1 Expression der transgenen mRNA

Zum Nachweis der transgenen COX-2-mRNA wurde die Gesamt-RNA von Epidermis verschiedener Körperregionen und verschiedener Organe von 7 Wochen alten transgenen Tieren der Linien 4, 667, 675 extrahiert. Als Kontrolle diente RNA der Wildtyp-Geschwister. Artspezifische Sequenzunterschiede im 3' UTR-Bereich wurden genutzt, um zwischen transgener und endogener COX-2-mRNA in der RT-PCR-Analyse zu unterscheiden.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 19. Wie zu erkennen, wurde in den Keratin 5 exprimierenden Epithelien (Epidermis, Vormagen und Ösophagus) die transgene mRNA in allen getesteten transgenen Mauslinien nachgewiesen. Zunge war ebenfalls positiv für das 460 bp-Amplikon. Außerdem wurde das transgene Transkript bei allen untersuchten Linien in der Lunge, in den Linien 675 und 4 außerdem im Gehirn sowie schwach in Niere und Herz nachgewiesen, während Leber, Pankreas, Milz, Kolon und Testis kein RT-PCR-Signal ergaben. Die Spezifität des Primerpaares wurde durch die Abwesenheit des charakteristischen 460 bp-Amplikons in allen Wildtyp-Geweben bestätigt (Abb. 19).

Eine Vervielfältigung genomischer DNA war auszuschließen, weil das gewählte Primerpaar über der 3'UTR-Intronsequenz lag und eine Amplifikation ein PCR-Produkt von 926 bp ergäben hätte. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde durch die Amplifikation der β -Aktin-cDNA kontrolliert und ergab in etwa vergleichbare Signalintensitäten für jede Probe (Abb. 19). Als Positivkontrolle diente die stabile K5-COX-2-BMGE⁺-Transfektante, Zelllinie 1 (Abb. 13 B und 19).

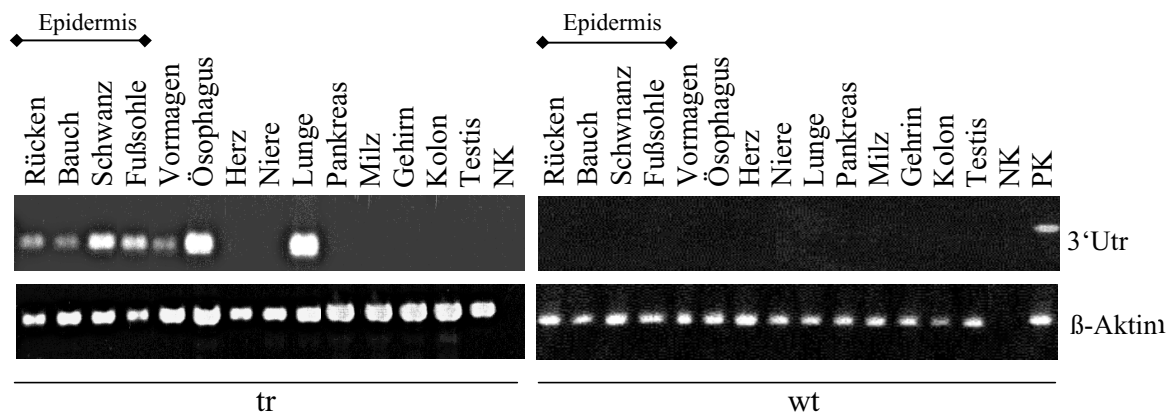


Abb. 19: RT-PCR-Analyse der Expression von transgener K 5-COX-2-mRNA

Dargestellt ist eine Analyse mit 7 Wochen alten Tieren der transgenen Linie 667 im Vergleich zu Wildtyp-Geschwistern. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wurde je 1 µg RNA in cDNA umgeschrieben. Die anschließende PCR erfolgte mit dem transgenspezifischen 3' UTR-Primerpaar 667/683 (cDNA: 460 bp; genomische DNA: 926 bp). Zur Kontrolle der Reversen Transkriptase-Reaktion wurde eine 429 bp Sequenz der Maus-β-Aktin-cDNA mit dem Primerpaar 24/25 amplifiziert.

PK (Positivkontrolle): Gesamt-RNA-Präparation aus stabil mit dem K5-COX-2-Konstrukt transfizierten BMGE⁺-Zellen (Linie 1); NK (Negativkontrolle): PCR ohne vorhergehende Reverse Transkriptase-Reaktion

Als nächstes wurde versucht, transgene COX-2-mRNA in 10 µg Gesamt-RNA-Präparationen von Epidermis verschiedener Körperregionen und verschiedener Organe (Abb. 20 A), die von 7 Wochen alten transgenen Tieren der Linien 4, 667 und 675 sowie ihrer gleichaltrigen Wildtyp-Geschwister stammten, mittels Northern Blot-Hybridisierung einer ³²P-markierten COX-2-cDNA-Sonde nachzuweisen. Repräsentatives Autoradiogramme sind in Abbildung 20 zusammengestellt. Demnach exprimierten Tiere der Linien 667, 675 und 4 in der Epidermis von Bauch, Rücken, Schwanz, Ohr und Fuß authentische COX-2-mRNA-Spezies, erkennbar an der charakteristischen Bande bei ca. 3,4 kb. Die Expression dieser Spezies korrelierte mit der Expression zweier weiterer 4,8 und 2,2 kb großen RNA-Spezies, möglicherweise Transkripte des endogenen COX-2-Gens. Außerdem war Lunge auch bei dieser Analyse für die 3,4 kb transgene COX-2-mRNA sowie die 4,8 und 2,2 kb großen mRNA-Spezies positiv. Ferner konnten gelegentlich in einigen Tieren schwache Hybridisierungssignale in Ösophagus, Zunge, Vormagen und Gehirn nachgewiesen werden. Herz, Niere, Leber, Pankreas, Milz, Kolon und Hoden exprimierten hingegen keine COX-2-spezifischen mRNA-Spezies, weder transgene noch endogene. In Organen von Wildtyp-Tieren waren keine COX-2-mRNA-Transkripte nachweisbar (Abb. 20).

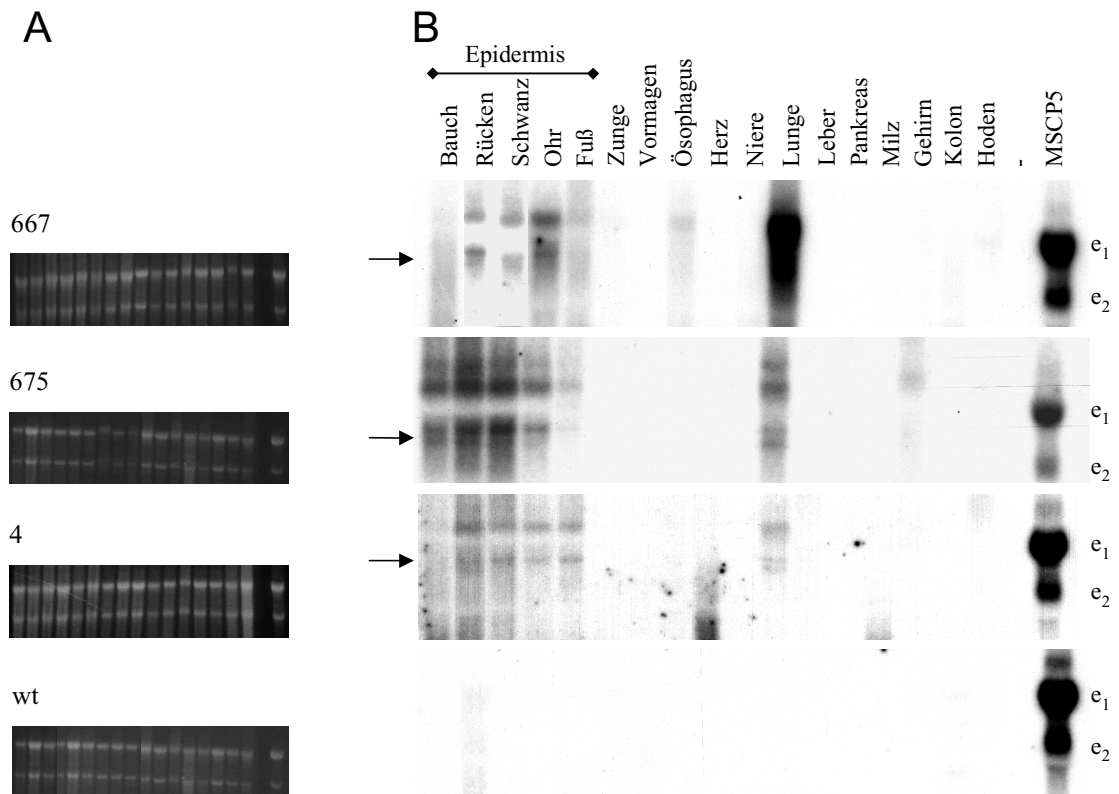


Abb. 20: Northern Blot- Analyse der COX-2-mRNA-Expression in verschiedenen Organen von transgenen Tieren der Linien 667, 675, 4 und Wildtyp-Mäusen

(A) Ethidiumbromid-gefärbte RNA nach Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

(B) Die Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Geweben einschließlich Epidermis verschiedener Körperregionen (Bauch, Rücken, Schwanz, Ohr, Fuß) mit Chloroform/Phenol extrahiert und je 10 µg im Northern Blot analysiert. Der Nachweis der COX-2-mRNA erfolgte mittels einer ³²P-markierten COX-2-cDNA-Sonde. Als Positivkontrolle wurde Gesamt-RNA von MSCP5-Keratinocyten, die COX-2 konstitutiv exprimieren, eingesetzt.

- Spur ohne RNA
- e endogene COX-2-mRNA; 4,8 kb (e₁) , 2,2 kb (e₂)
- transgene COX-2-mRNA; 3,3 kb

5.3.2 COX-Proteinexpression in K5-COX-2 transgenen Mäusen

Als nächstes wurde überprüft, ob COX-2-Protein in transgenen Organen überexprimiert wurde. Der Versuch wurde mit gleichaltrigen transgenen und –als Kontrolle– mit nicht-transgenen Geschwistern im Alter von 7 Wochen durchgeführt. Zum Vergleich wurde auch die COX-1-Expression bestimmt.

Aus 0,5 mg Gewebehomogenat von Rücken-, Bauch- und Schwanzepidermis sowie den ebenfalls stratifizierten Epithelien von Zunge und Vormagen (von Ösophagus stand zu wenig Gewebe zur Verfügung) wurden COX-2 und COX-1 unter Verwendung isoenzymspezifischer Antiseren sequenziell immunpräzipitiert und im Immunblot nachgewiesen. Abbildung 21 zeigt das Resultat eines repräsentativen Versuches für Tiere der Linien 4, 667 und 675 sowie für Wildtyp-Mäuse. Die für das COX-2-Protein charakteristische Bande von 72-74 kd war am intensivsten in der Schwanzepidermis, gefolgt von Rücken- und Bauchepidermis. Gelegentlich war COX-2-Protein auch im Vormagen nachweisbar, wie für Linie 667 gezeigt. Aus Homogenaten von Zunge war es hingegen nicht möglich, COX-2 bis über die Nachweisgrenze anzureichern. In Epidermis, Zunge oder Vormagen der Wildtyp-Geschwister wurde kein COX-2-Immunsignal detektiert.

In allen Proben von transgenen Tieren war COX-1-Protein als charakteristische Bande bei 72 kd darstellbar. Die konstitutive Expression von COX-2 schien keinen Effekt auf die Steady-State-Konzentration von COX-1-Protein auszuüben. In Geweben von Wildtyp-Tieren war, wie erwartet, COX-1-Protein ebenfalls exprimiert.

Diese Analysen zeigten eine konstitutive COX-2-Überexpression in der Epidermis verschiedener Körperregionen transgener Tiere. Die weiteren Untersuchungen wurden mit heterozygoten Tieren der stark COX-2 exprimierenden Linien (4, 663, 667, 678 und 675) durchgeführt.

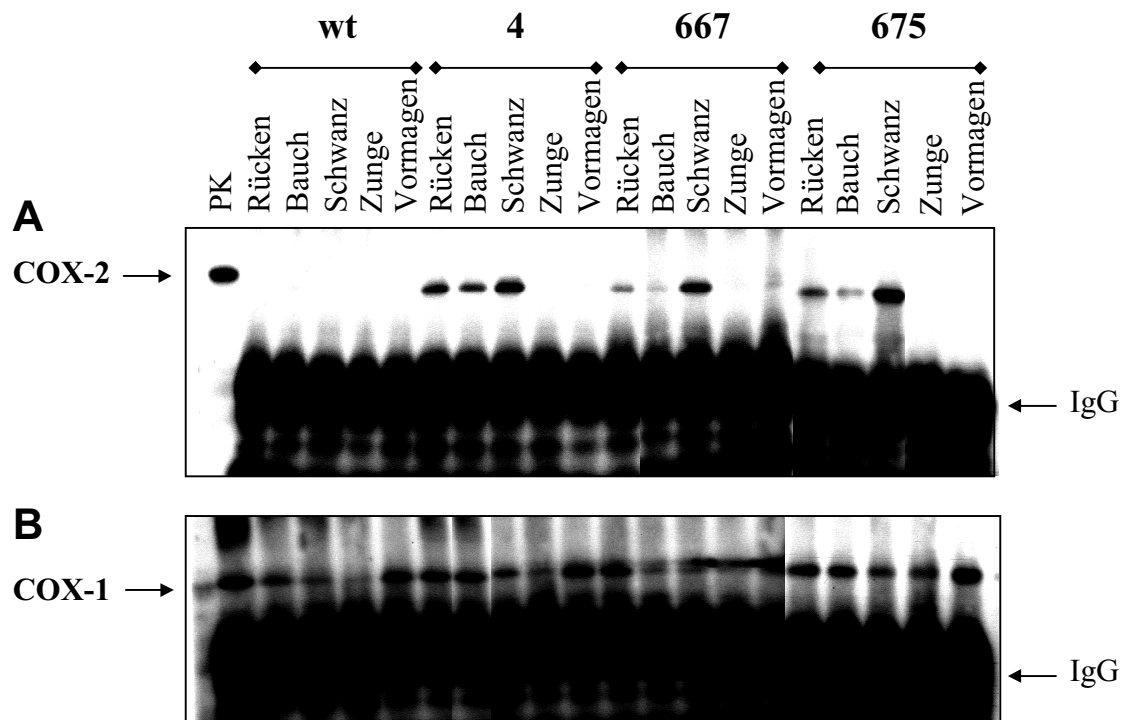


Abb. 21: Expression von COX-1 und COX-2-Protein in stratifizierten Epithelien von transgenen und Wildtyp-Mäusen

Zum Nachweis der COX-Isoenzyme wurden Organhomogenate von Keratin 5-exprimierenden Epithelien (Rücken-, Bauch- und Schwanzepidermis, Zunge und Vormagen) von 7 Wochen alten transgenen (Linie 4, 667, 675) und Wildtyp-Mäusen hergestellt. Die COX-Isoformen wurden aus 500 µg Gesamtprotein mit spezifischen Antikörpern gegen COX-2 und COX-1 sequenziell immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden in Laemmli-Probenpuffer denaturiert, im 7,5% SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Immobilonmembran transferiert und im Immunblot unter Verwendung der isoenzymspezifischen Antisera nachgewiesen.

(A) COX-2-, (B) COX-1-Immunblot

PK (Positivkontrolle): Zellhomogenat aus PDV-Keratinocyten, die beide COX-Isoenzyme exprimieren
IgG, Immunglobulin G aus der Immunpräzipitation

5.3.3 Immunhistochemischer Nachweis der COX-Isoenzyme Schwanzhaut

Keratin 5 ist ein Bestandteil der Intermediärfilamente basaler, proliferationsaktiver Keratinozyten und wird außerdem in der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel sowie in Basalzellen des Talgdrüsenepithels exprimiert (Abb. 8). Die durch den Keratin 5-Promotor gesteuerte Expression des COX-2-Transgens wurde daher in diesen Kompartimenten der Haut erwartet. Zur Bestätigung wurde eine immunhistochemische Untersuchung durchgeführt. Da die in der Folge beschriebenen phänotypischen Veränderungen besonders stark in Schwanzhaut auftraten, war die Lokalisierung der COX-Expression in diesem Gewebe von besonderem Interesse.

Von Schwanzhaut erwachsener K5-COX-2-Mäuse und ihrer Wildtyp-Geschwister wurden Gefrierschnitte angefertigt und die COX-Expression mit isoenzymspezifischen COX-Antikörpern und Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern lokalisiert.

In der Schwanzhaut von transgenen Tieren war COX-2 in Basalzellen der interfollikulären Epidermis, der äußeren Wurzelscheide der Haarfollikel und des peripheren Talgdrüsenepithels exprimiert (Abb. 22 C-H). In transgenen Haarfollikeln war COX-2, unabhängig vom Haarzyklus, nachweisbar.

Dieses Expressionsmuster der transgenen COX-2 stimmte also mit der epidermalen K 5-Promotoraktivität überein. Zusätzlich wurde COX-2-Protein in transgener Epidermis in suprabasalen Keratinozyten hyperplastischen papillärer Lämpchen detektiert (Abb. 22 G, s. 5.7.1).

Im Gegensatz dazu waren in Wildtyp-Haut nur vereinzelte suprabasale Keratinozyten der interfollikulären Epidermis für COX-2 immunpositiv (Abb. 22 A, B). Im Stratum basale wurden keine COX-2 nachgewiesen. In den Basalzellen der äußeren Wurzelscheide sowie dem Talgdrüsenepithel von Wildtyp-Mäusen wurde dagegen eine transiente, haarzyklusabhängige COX-2-Expression beobachtet: wachsende (anagene) Haarfollikel zeigten intensive Signale für COX-2, die während der katagenen Phase kontinuierlich an Intensität abnahmen; in ruhenden (telogenen) Haarfollikeln war COX-2-Protein nicht detektierbar.

Ein Vergleich der COX-1-Expression in transgener und Wildtyp-Haut zeigte keine signifikanten Unterschiede (Abb. 23). COX-1 fand sich in suprabasalen Keratinozyten und dendritischen Zellen, vermutlich Langerhanszellen. Auffällig war die erhöhte Anzahl COX-1-positiver Langerhanszellen im Infundibulum der K5-COX-2-transgenen Haarfollikel (Abb. 23 D).

Die Spezifität der Immunsignale für COX-2 und COX-1 wurde durch Peptidkompetitions- und Färbungen ohne ersten Antikörper sichergestellt.

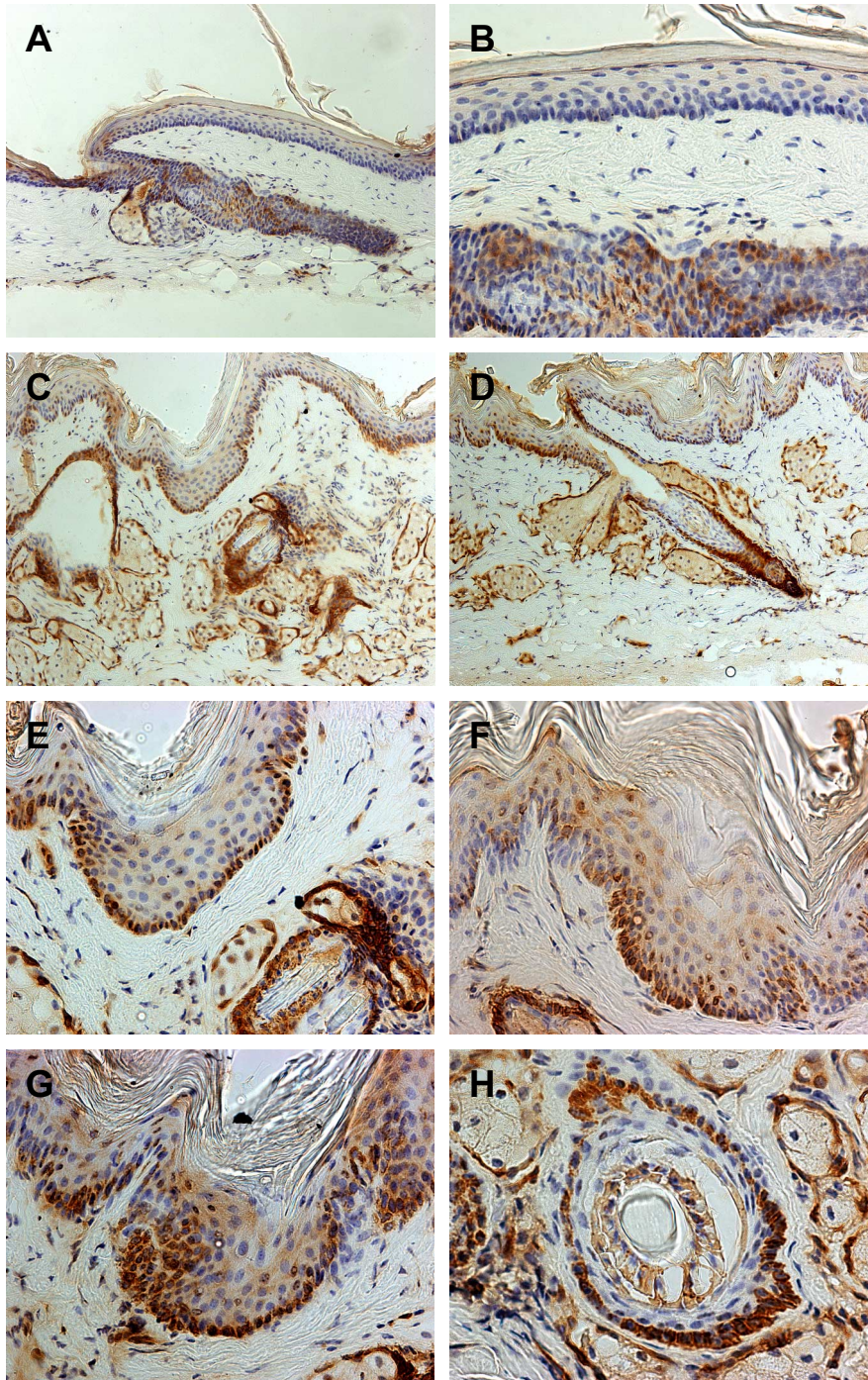


Abb. 22: Lokalisation von COX-2-Protein in Wildtyp- und transgener Schwanzhaut

Die Gefrierschnitte von Schwanzhaut 10 Monate alter Tiere wurden in 1% Paraformaldehyd fixiert. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungskapazitäten wurde der COX-2-spezifische Antikörper SC 1745 aufgetragen. Der Inkubation mit dem sekundären, Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper, schloß sich die DAB-Substratreaktion an. Anschließend wurden die Präparate mit Hämatoxylin gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Xylol-haltigem Eukitt eingebettet.

(A, B) Wildtyp, (C-H) transgene Tiere der Linien 667 (C, E), 675 (D, G) und 678 (F)

Vergrößerungen: 1:160 (A, C, D), 1:400 (B, E-G) und 1:630 (H)

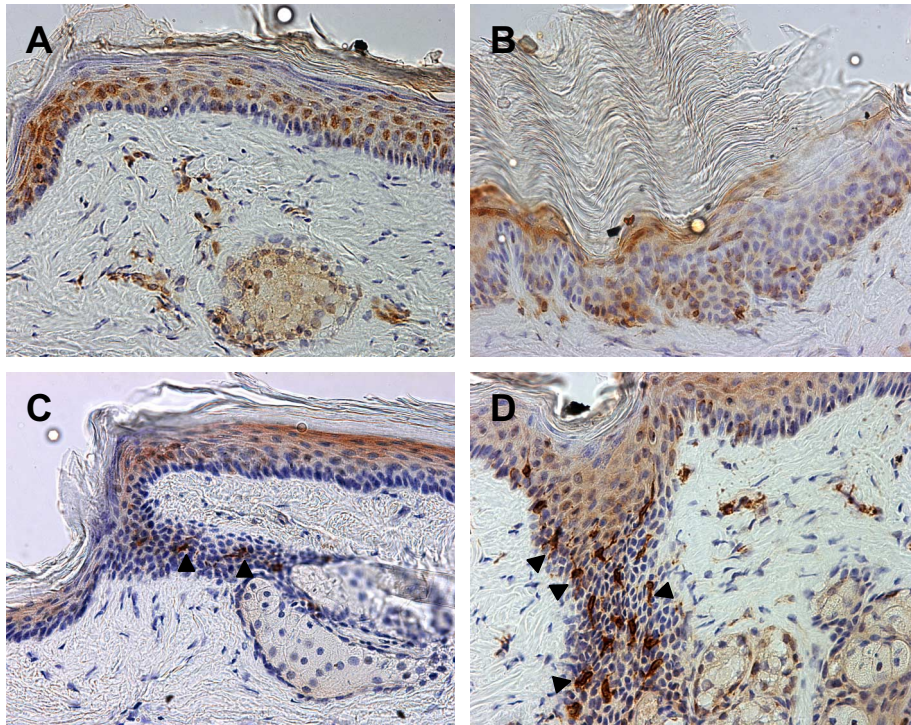


Abb. 23: Lokalisation von COX-1-Protein in Wildtyp- und transgener Schwanzhaut

Die Detektion von COX-1-Protein in Gefrierschnitten von Schwanzhaut 10 Monate alter Tiere erfolgte mit dem COX-1-spezifischen Antikörper SC1754 (Einzelheiten s. Abb. 22).

(A, C) Wildtyp- und (B, D) transgene Tiere der Linien 667 und 675

Vergrößerung: 1:400, ► dendritische Zellen

5.3.4 Prostaglandin-Nachweis in Epidermis und Blutplasma K5-COX-2-transgener Tiere

Um zu Überprüfen, ob die transgene Expression von COX-2 zu einer erhöhten Prostaglandin-Synthese führte, wurden die Lipide aus pulverisierter Rücken- und Schwanzepidermis durch ethanolische Extraktion und anschließende Octadecyl-Festphasenextraktion nach Powell angereichert und mittels Enzym-Immun-Assay auf die Prostaglandine (PG) E_2 und $F_{2\alpha}$, die Haupttypen der epidermalen Prostaglandine, untersucht.

Im Vergleich zu Wildtyp-Epidermis waren die Spiegel von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ in transgener Epidermis um das 3-5-fache erhöht. Dieses war sowohl in Schwanzepidermis der 10 Monate alten Founder-Mäuse 667 und 675 (Abb. 24 A) als auch in Rückenepidermis von 3 Monate alten Tieren der Linien 667 und 675 der Fall (Abb. 24 B). Darüber hinaus war in transgener Haut die Konzentration von 6-Keto- $PGF_{1\alpha}$, einem stabilen Metaboliten des Prostacyclins, das von Fibroblasten und Endothelzellen nicht aber Keratinozyten produziert wird, im Vergleich zu Wildtyp-Haut um das Doppelte erhöht (Abb. 24 C).

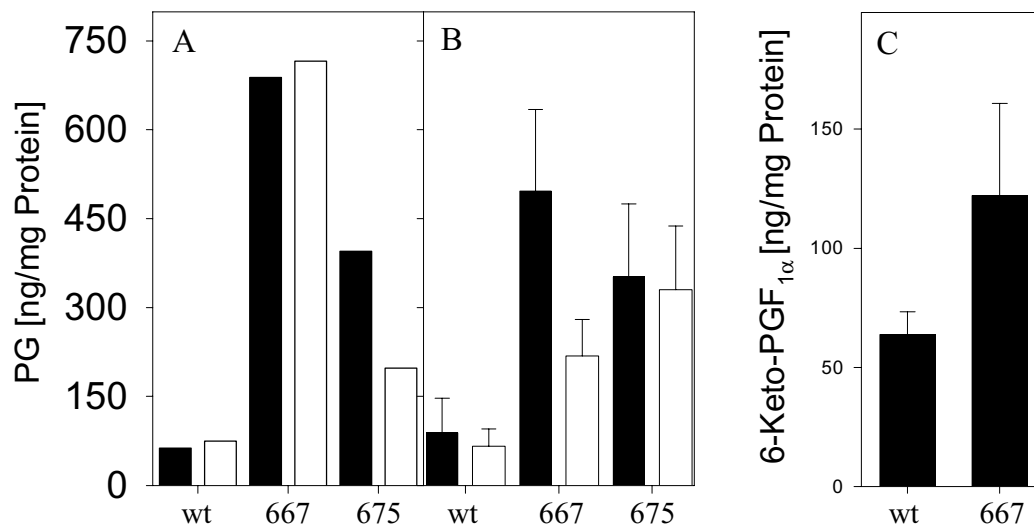


Abb. 24: Prostaglandin-Konzentration in COX-2-transgener und Wildtyp-Haut

Die Prostaglandin-Konzentrationen von transgener und Wildtyp-Haut wurden mittels Enzym-Immun-Assay nach vorangegangener Anreicherung der ethanolisch extrahierten Lipidfraktion über C₁₈-Silicasäulen bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte ± SD.

(A) PGE_2 - und $PGF_{2\alpha}$ -Konzentrationen in Schwanzepidermis von Wildtyp- und der Founder-Tiere 667 und 675 (n = 1),

(B) PGE_2 - und $PGF_{2\alpha}$ - Spiegel in transgener und Wildtyp-Rückenepidermis (n = 5, Student's T-Test: p ≤ 0,0002-0,003). (A, B) schwarze Balken: PGE_2 , offene Balken: $PGF_{2\alpha}$

(C) 6-Keto- $PGF_{1\alpha}$ -Konzentrationen in Schwanzhaut 12 Wochen alter Tiere (n = 3; Student's T-Test: p ≤ 0,001).

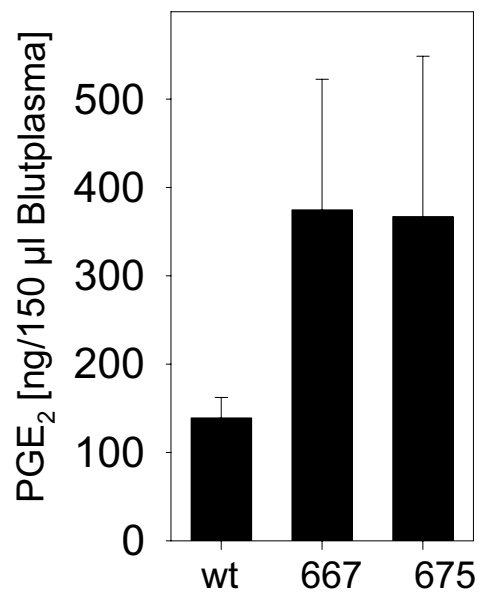


Abb. 25: PGE₂-Konzentration im Blutplasma

12 Wochen alten Wildtyp-Tieren und Mäusen der Linien 667 und 675 wurde retrobulbär Blut entnommen. Die Isolierung von PGE₂ erfolgte aus thrombozytenarmen Plasma über PGE₂-Affinitätssäulen. Quantifiziert wurden die PGE₂-Konzentrationen im Enzym-Immun-Assay. Die Werte sind Mittelwerte \pm SD ($n = 5$; Student's T-Test: $p \leq 0,015$ für 667 und $p \leq 0,04$ für 675).

Außerdem wurden etwa 3-fach erhöhte PGE₂-Spiegel in Blutplasma transgener Tiere der Linien 667 und 675 gemessen (Abb. 25).

5.4 Phänotyp der COX-2-transgenen Mäuse

Die transgene COX-2-Expression korrelierte mit starken phänotypischen Veränderungen. Ein in allen transgenen Linien ausgeprägtes Merkmal war das drastisch verstärkte Krallenwachstum an Hinter- und Vorderfüßen (Abb. 26 A, B). Um Verletzungen und ein Einwachsen der Nägel in die Fußsohlen zu vermeiden, mußten den Tieren die Krallen im 14-tägigen Rhythmus gekürzt werden.

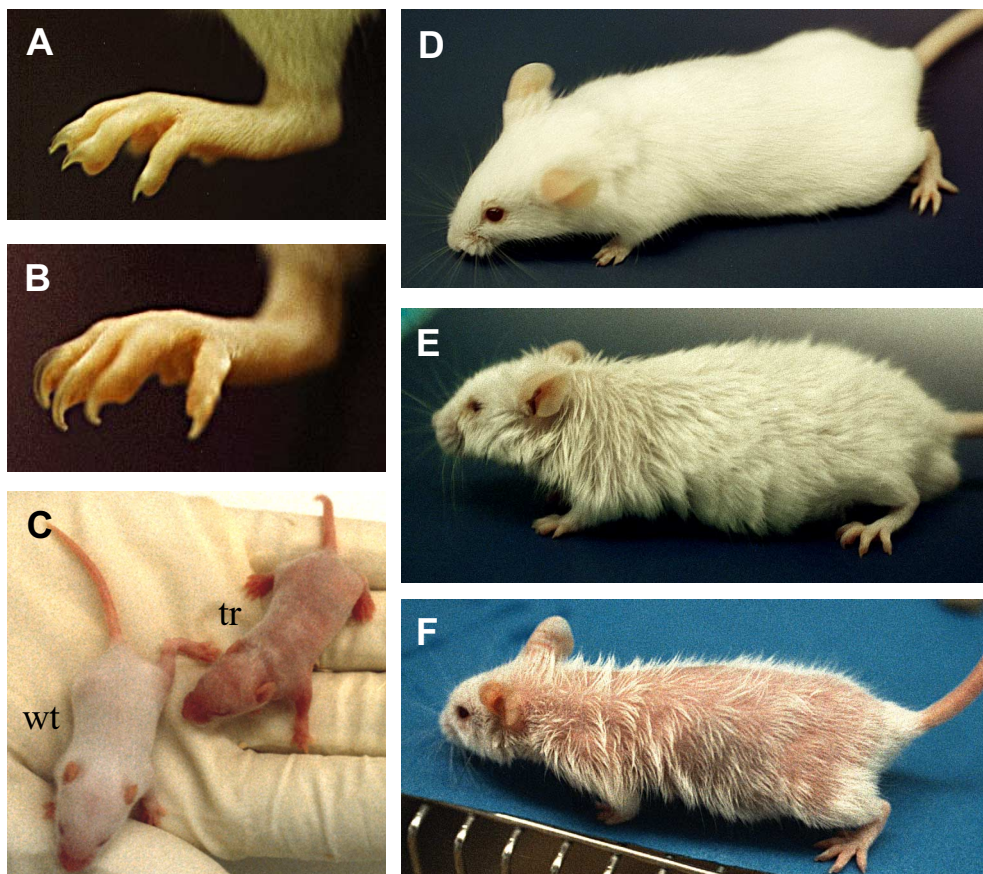


Abb. 26: Phänotyp von K5-COX-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen

(A) Hinterfuß einer 3 Monate alten Wildtyp- und (B) einer gleichaltrigen transgenen Maus, (C) transgenes (tr) und nicht-transgenes (wt) Geschwister-Tier im Alter von 9 Tagen, (D) 3 Monate alte Wildtyp-NMRI-Maus; 3 Monate alte transgene Tiere mit (E) moderatem und (F) starkem Phänotyp

Obwohl sich die transgenen Jungtiere direkt nach der Geburt nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern unterschieden, zeigten sich postnatal ab Tag 9 erste Unterschiede in der Ausbildung des Haarkleides. Während bei Wildtyp-Jungtieren die gesamte Körperoberflä-

che mit ersten Haaren bedeckt war, sahen die transgenen Mäuse noch nackt aus. Im Alter von 7 Wochen hatten die transgenen Tiere ein Fell entwickelt, dieses war aber deutlich weniger dicht. Selbst nach weiteren Haarzyklen blieb dieses Merkmal erhalten. Der beobachtete Haarphänotyp trat nicht geschlechtsspezifisch auf und war in verschiedenen Körperregionen unterschiedlich stark ausgeprägt. Besonders der Rücken- und Nackenbereich sowie die Flanken an Vorder- und Hinterläufen waren betroffen. Mit zunehmendem Alter intensivierte sich der kahle Eindruck. Innerhalb der transgenen Linien wurden bei den heterozygoten Mäusen Schwankungen in der Ausprägung des Haarkleides beobachtet. Dies gilt insbesondere für Tiere im Alter bis zu 3 Monaten (Abb. 26 E, F). Bei älteren Tieren dominierte der kahlere Phänotyp. Ebenfalls altersabhängig nahm die Verfettung des Haarkleides zu. Des weiteren schuppte die Schwanzhaut der transgenen Tiere im Vergleich zu Wildtyp-Tieren stärker ab, was beim Präparieren der Häute besonders auffiel.

5 Woche alte transgene Mäuse der Linie 667 hatten ein geringeres Körpergewicht als ihre Wildtyp-Geschwister. Wildtyp-Männchen wogen durchschnittlich $29,1 \pm 2,4$ g, transgene $24,6 \pm 3,3$ g ($n_{wt}=26$, $n_{tr}=37$, nach Student's t-Test $p \leq 0,0001$, \pm SD). Wildtyp-Weibchen wogen im Mittel $23,9 \pm 2,0$ g, ihre transgenen Schwestern $21,8 \pm 1,8$ g ($n_{wt}=27$, $n_{tr}=23$, $p \leq 0,0011$, Student's t-Test, \pm SD).

Im Alter von 6-10 Monaten entwickelten einige transgene Tiere eine schwere chronische oder floride granulierende, mit Vernarbungen einhergehende Pankreatitis mit ausgeprägter Zystenbildung. Im betroffenen Gewebe wurden fokale Ganghyperplasien mit herdförmigen Epitheldysplasien diagnostiziert, die durch eine Infiltration mit mononukleären und granulozytären Lymphozyten gekennzeichnet waren. Dies ergab die pathologisch-anatomische Untersuchung von 15 exemplarisch ausgewählten transgenen Mäusen durch Prof. Dr. Gröne, DKFZ. Außerdem wurden bei einigen Mäusen pathologische Veränderungen von Niere, Milz und Lunge festgestellt. Milzgewebe von 5 an Pankreatitis erkrankten Tieren wies eine leichte Hyperplasie der Pulpa auf. Eine milde Glomerulonephritis oder Hydronephrose wurde bei 4 Tieren diagnostiziert. Des weiteren litten 7 Tiere an einer Peribronchitis mit entzündlichen Lungeninfiltraten, die nicht auf virale oder bakterielle Infektionen zurückzuführen waren. Bei männlichen Tieren der transgenen Linien 4, 663, 667, 675 und 678 traten ab einem Alter von 6 Monaten regelmäßig in der Nähe des Schwanzansatzes subkutan, mit serösem Inhalt gefüllte Zysten mit einem Durchmesser von 0,5 cm auf. Sie wurden als papillomatöse, nicht entzündliche Wucherungen der perigenitalen Bulbourethral-Drüse identifiziert. Dieser Befund basiert auf der Untersuchung von 12 verschiedenen Tieren.

5.5 Postnatale Morphogenese der Rückenepidermis und der Haarfollikel

5.5.1 Haarwachstum in transgener Rückenhaut

Eine histologische Untersuchung der Rückenhaut zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Geburt sollte Aufschluß darüber geben, ob das verzögerte Haarwachstum der neugeborenen transgenen Tiere auf einer Störung der postnatalen Haarfollikelmorphogenese beruhte. Hierzu wurden Häute von transgenen Tieren und gleichaltrigen Wildtyp-Geschwistern im Alter von 1, 9 und 12 (finale Phase der Haarfollikelmorphogenese), 17 Tagen (Beginn der katagenen Phase des Haarzyklus), 21 Tagen (Beginn der telogene Phase des Haarzyklus) sowie 28 Tagen (frühe Anagenphase des 1. Haarzyklus) für die Hämatoxylin/Eosin (HE)-Färbung vorbereitet. Diese Studien ergaben, daß die Haarfollikelmorphogenese bei transgenen Tieren tatsächlich verzögert war (Abb. 27).

Am ersten Tag nach der Geburt befanden sich sowohl die Wildtyp- (Abb. 27 A) als auch die transgenen (Abb. 27 B) Haarfollikel zwischen Stadium 5 und 6 der Morphogenese nach Paus und Hardy (Hardy, 1992, Paus et al., 1999a). Die dermale Papille war komplett von der Haarzwiebel umschlossen und die innere Wurzelscheide im gesamten Isthmusbereich vollständig ausgebildet. Vereinzelt war die für Stadium 6 charakteristische oberflächliche Einstülpung des sich ausbildenden Haarkanals zu beobachten. Auffallend waren bereits in diesem Stadium die veränderten Winkel mit denen die transgenen Haarfollikel in die Dermis einwuchsen. Dies war auch am 9. Tag deutlich zu erkennen. Die transgenen Haarfollikel wuchsen nahezu im rechten Winkel zur Hautoberfläche (Abb. 27 E), die Wildtyp-Haarfollikel dagegen im typischen 45°-Winkel (Abb. 27 B). Die Wildtyp-Haarfollikel besaßen zu diesem Zeitpunkt die für das Stadium 8 charakteristische Morphologie und waren zu voller Länge ausgewachsene, anagene Haarfollikel. Die Haarzwiebeln der meisten Follikel stießen in der Subcutis an den Panniculus carnosus. Auch die Haarzwiebeln der meisten transgenen Follikel reichten bis an den Panniculus carnosus. Allerdings waren die transgenen Haarfollikel wegen der rechtwinkligen Anordnung um ca. 50% kürzer. Dies korrelierte mit einer insgesamt dünneren Rückenhaut in transgenen Tieren. Die transgenen Haarfollikel hatten zu diesem Zeitpunkt in ihrer Entwicklung erst Stadium 7 der Haarfollikelmorphogenese erreicht. Die innere Wurzelscheide umgab den Haarschaft noch vollständig, die Haarspitze war auf Höhe der Talgdrüse lokalisiert und noch nicht in den sich ausbildenden Haarkanal eingedrungen. Die verzögerte Bildung der Haarschäfte bedingte offensichtlich das kahle Erscheinungsbild der transgenen Jungtiere. Erst zwischen Tag 12 und 17 brachen vereinzelt Haare durch die Rückenhaut der transgenen Mäuse. Die Schaftbildung war aber bei der Mehrzahl der Haarfollikel noch merklich verzögert, wie auch in Abbildung 28 H (Tag 12) und 28 I (Tag 17) zu erkennen ist.

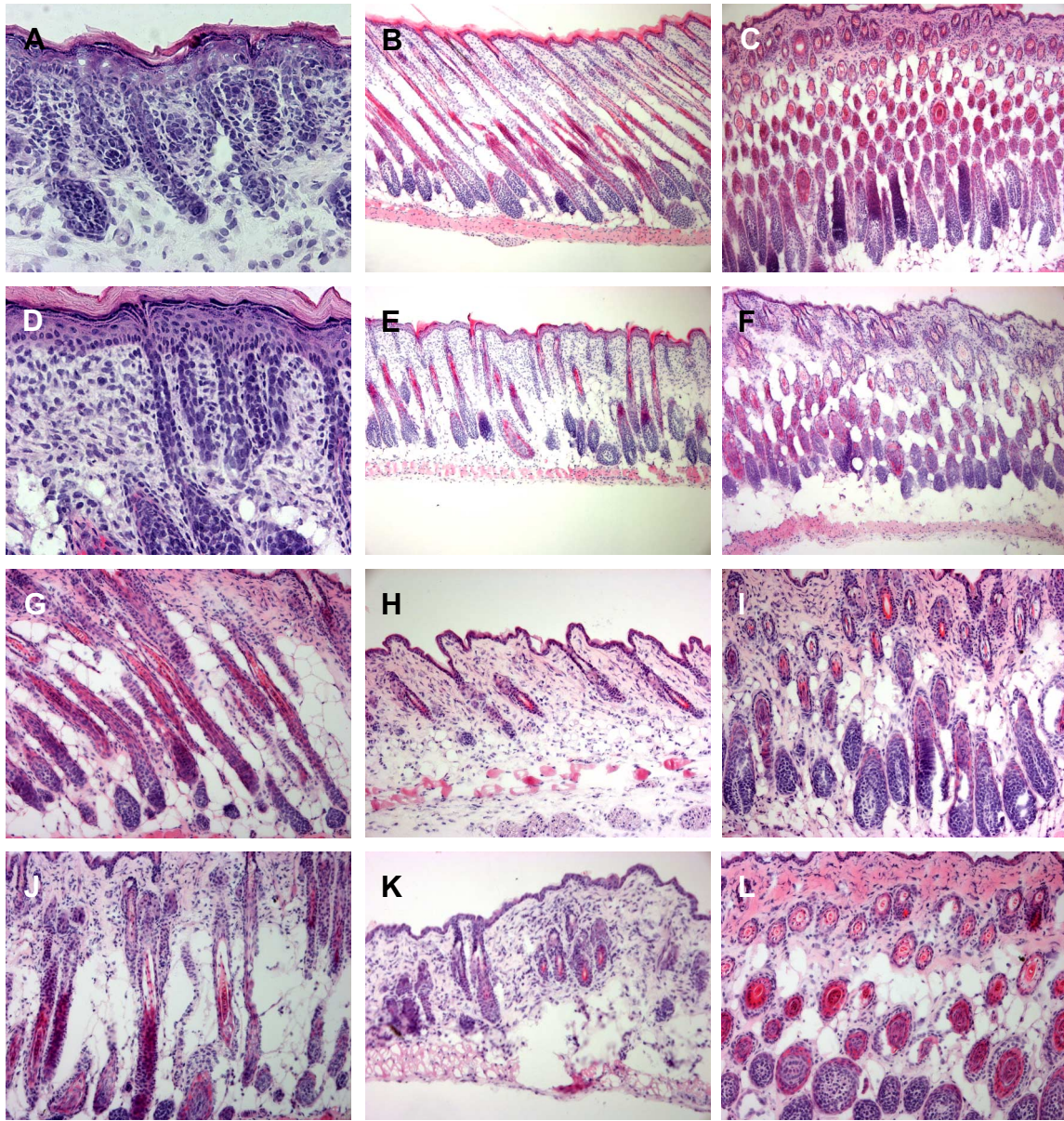


Abb. 27: Postnatale Haarfollikelmorphogenese und erster Haarzyklus bei K5-COX-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen

Gezeigt sind Kryoschnitte neonataler Rückenhaut 1-28 Tage alter Tiere (in 1% Paraformaldehyd fixiert und mit Hämatoxylin/Eosin (HE) angefärbt).

Haarfollikelmorphogenese (A-F): Wildtyp-Tiere, Alter 1 Tag (A), 9 Tage (B) und 12 Tage (C). Transgene Tiere, Alter 1 Tag (D), 9 Tage (E) und 12 Tage (F)
Vergrößerungen: 1:160 (B, C, E, F), 1:400 (A, D)

Erster Haarzyklus (G-L): Wildtyp-Tiere, Alter 17 Tage (H), 21 Tage (I) und 28 Tage (J)
Transgene Tiere, Alter 17 Tage (H), 21 Tage (K) und 28 Tage (L)
Vergrößerungen: 1:160

Am Tag 17 traten sowohl Wildtyp- als auch transgene Haarfollikel synchron in den ersten Haarzyklus ein. Die Haarzwiebeln bildeten sich zurück und die Haarfollikel verkürzten sich. Die 90°-Ausrichtung der transgenen Haarfollikel blieb erhalten und änderte sich auch nicht mit dem Übergang in die erste telogene Phase am Tag 21 (Abb. 27 K). Am 28. Tag nach der Geburt befanden sich sowohl die Wildtyp- als auch die transgenen Haarfollikel im anagenen Stadium (Abb. 27 I und L). Haarzyklusanomalien waren demnach in transgener Rückenhaul nicht gegeben.

5.5.2 Haarfollikeldichte in COX-2-transgener Rückenhaul

Im Alter von sieben Wochen befanden sich die Haarfollikel sowohl in Wildtyp- als auch transgener Rückenhaul in der telogenen Phase des Haarzyklus und waren in HE-gefärbten Schnitten morphologisch nicht voneinander zu unterscheiden (Abb. 28). Allerdings wurde in transgener Rückenhaul mit zunehmendem Alter eine Ausdünnung des Haarkleides beobachtet.

Die Auszählung von Serienschnitten von Rückenhaul 6 Monate alter Tiere ergab für Wildtyp-Haul einen Wert von 39 ± 5 , für Linie 675 18 ± 3 und für Linie 667 17 ± 3 Haarfollikel pro Gesichtsfeld (insgesamt wurden je drei Schnitte von Tieren mit repräsentativem, moderatem Phänotyp bei einer 1:100 Vergrößerung ausgewertet). Die Haarfollikeldichte in transgener Haul war demnach durchschnittlich um 50% reduziert.

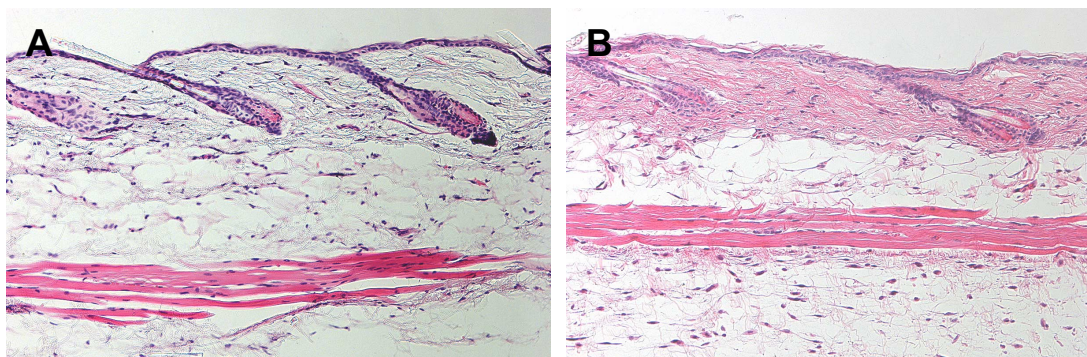


Abb. 28: Rückenhaul 7 Wochen alter Wildtyp- (A) und transgener Mäuse (B)
HE-Färbungen von Paraffinschnitten
Vergrößerung: 1:160

5.5.3 Postnatale Verdünnung der interfollikulären Epidermis

Die Morphogenese der Mausepidermis beginnt zwischen dem 7. und 12. Tag und endet mit der Ausbildung des Stratum corneum zwischen dem 18. und 20. Tag der Embryonalentwicklung.

In der frühen postnatalen Phase setzt in der Bauch- und Rückenhaut die Umbildung der interfollikulären Epidermis zum adulten Phänotyp ein. Dabei verdünnt sich das Epithel durch eine Reduzierung der suprabasalen Zellschichten auf ein bis zwei Lagen und des Str. corneums. Das Ergebnis ist ein dünnes, relativ schwach verhorntes Epithel mit orthokeratotischer terminaler Differenzierung.

Bei Wildtyp-Tieren lief dieser Umstrukturierungsprozess wie folgt ab (Abb. 29 A-E): am Tag 1 nach der Geburt setzte sich die Rückenepidermis aus einer Lage basaler, 8 Lagen suprabasaler Keratinozyten und einem gut ausgebildeten Str. corneum zusammen (Abb. 29 A). Im Alter von 9 Tagen war die Anzahl der suprabasalen Lagen auf 3-4 reduziert (Abb. 29 B) und am Tag 12 der adulte Phänotyp erreicht (Abb. 29 C).

Im Gegensatz dazu zeigte die Epidermis transgener Tiere der Linie 675 nach 9 Tagen immer noch bis zu 7 suprabasale Keratinozytenschichten und erreichte den adulten Phänotyp erst am Tag 28.

Die terminale Differenzierung schien in transgener Rückenepidermis nicht gestört zu sein, wie das Expressionsmuster differenzierungsspezifisch exprimierter epidermaler Strukturproteine zeigte (Abb. 30).

Signale für Keratin 5 wurden nur in den basalen Zellen der interfollikulären Epidermis und der äußeren Wurzelscheide (Abb. 30 E), für Keratin 10 im gesamten suprabasalen Kompartiment (Abb. 30 F), für Involucrin in den oberen Spinosum- und Granulosumzellen (Abb. 30 G) und für Loricrin ausschließlich in Granulosumzellen (Abb. 30 H) gefunden.

Dieses Muster entsprach dem von Wildtyp-Epidermis (Abb. 30 E-H) und stimmte mit Literaturdaten überein (Fuchs, 1995). Die verzögerte Umstrukturierung der interfollikulären Epidermis bei transgenen Mäusen wurde im übrigen auch in diesem Versuch deutlich: mit Keratin 10-, Involucrin- und Loricrin-Antikörpern wurden in transgener Epidermis mehr Zellschichten als beim Wildtyp angefärbt.

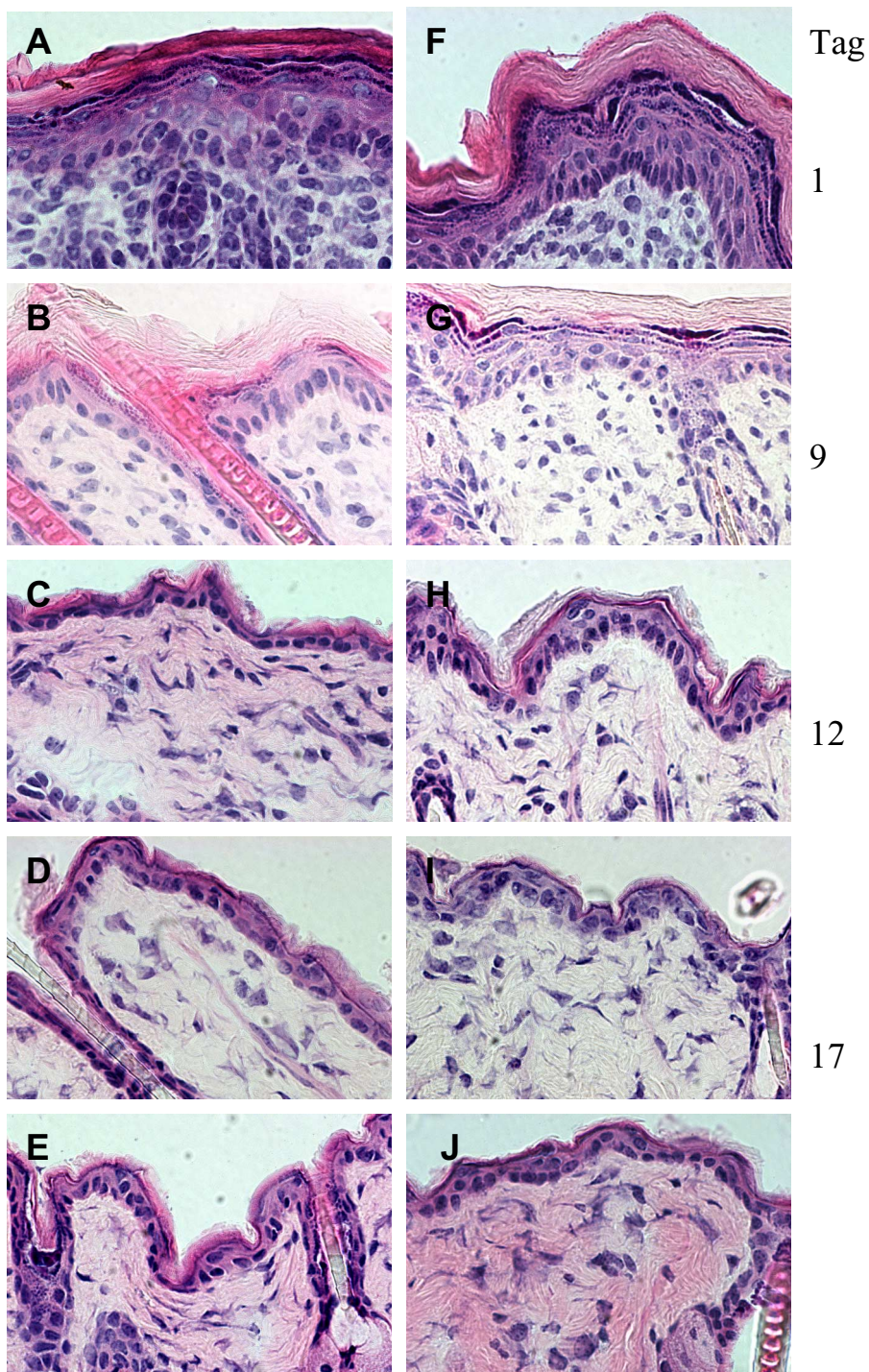


Abb. 29: Postnatale Entwicklung von interfollikulärer Epidermis von K5-COX-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen

Gezeigt sind HE-gefärbte Gefrierschnitte von Rückenhaut in Wildtyp- (A-E) und transgenen Mäusen der Linie 675, 1 Tag (A, F), 9 Tage (B, G), 12 Tage (C, H), 17 Tage (D, I) und 28 Tage (E, J), nach der Geburt.

Vergrößerung: 1:630

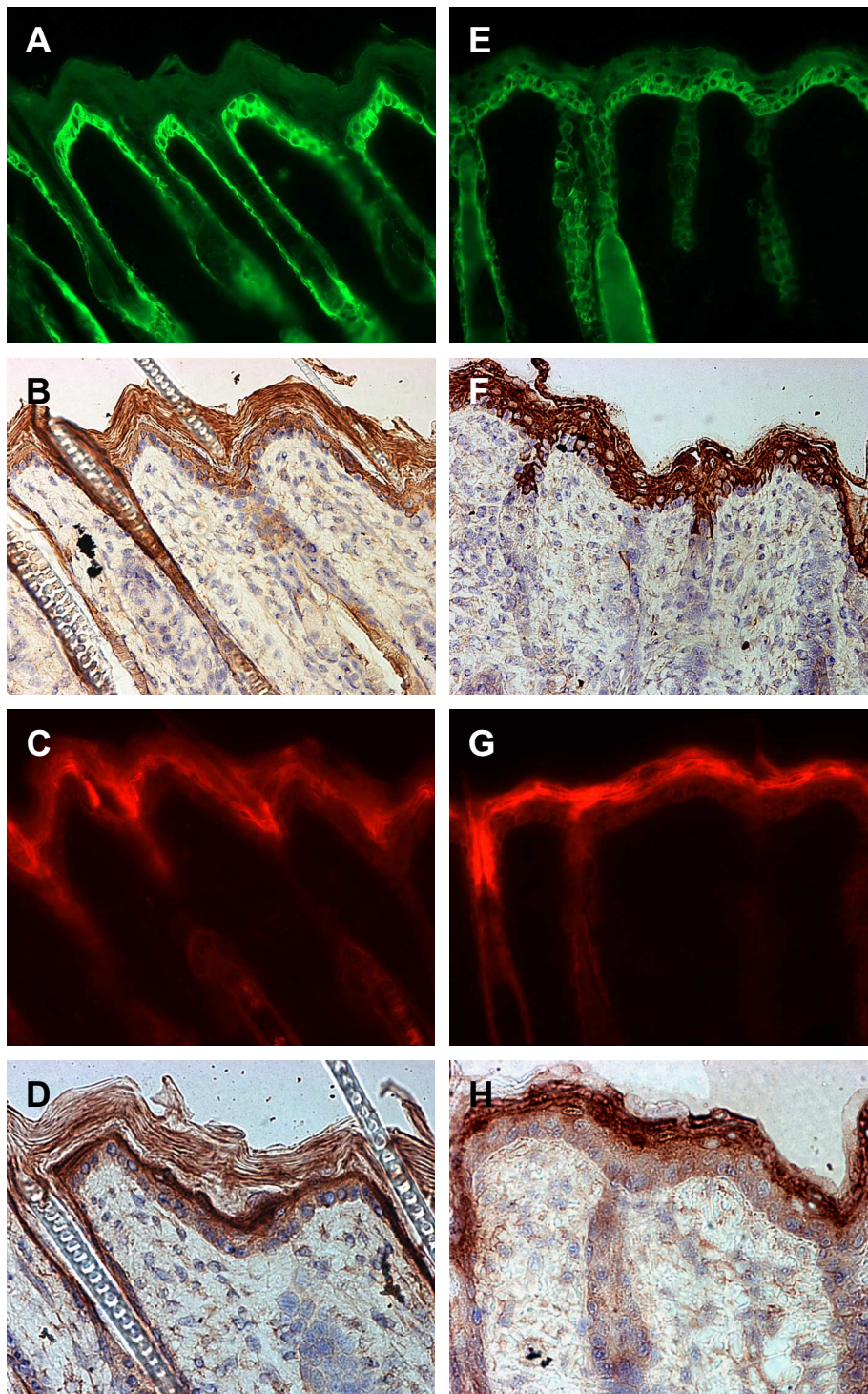


Abb. 30: Expression von epidermalen Differenzierungsmarkern in neonataler Haut von K5-COX-2-transgenen und Wildtyp-Mäusen

Gezeigt sind Gefrierschnitte von Rückenhaut 9 Tage alter Wildtyp- (A-D) und transgener Jungtiere (E-H), die mit spezifischen Antikörpern gegen Keratin 5 (A, E), Keratin 10 (B, F), Involucrin (C, G) und Loricrin (D, H) gefärbt wurden. Keratin 5 und Involucrin wurden mittels Immunfluoreszenz, Loricrin und Keratin 10 immunhistochemisch nachgewiesen.

Vergrößerung: 1:400

5.5.4 COX-Isoenzym-Expression in neonataler Haut

Eine immunhistochemische Untersuchung zeigte, daß die Expressionsmuster von COX-1 und COX-2 in Wildtyp- und transgener Haut am Tag 9 nach der Geburt jeweils vergleichbar waren (Abb. 31).

COX-2-Protein wurde in beiden Fällen sowohl in basalen und suprabasalen Keratinozyten der interfollikulären Epidermis, in der äußeren Wurzelscheide der wachsenden Haarfollikel als auch in peripheren Talgdrüsenepithelzellen gefunden. Die COX-1-Expression war dagegen auf suprabasale Keratinozyten sowie individuelle, in der Basalzellschicht oder im Infundibulum des Haarfollikels lokalisierte, dendritische Zellen beschränkt (Abb. 31 C, F).

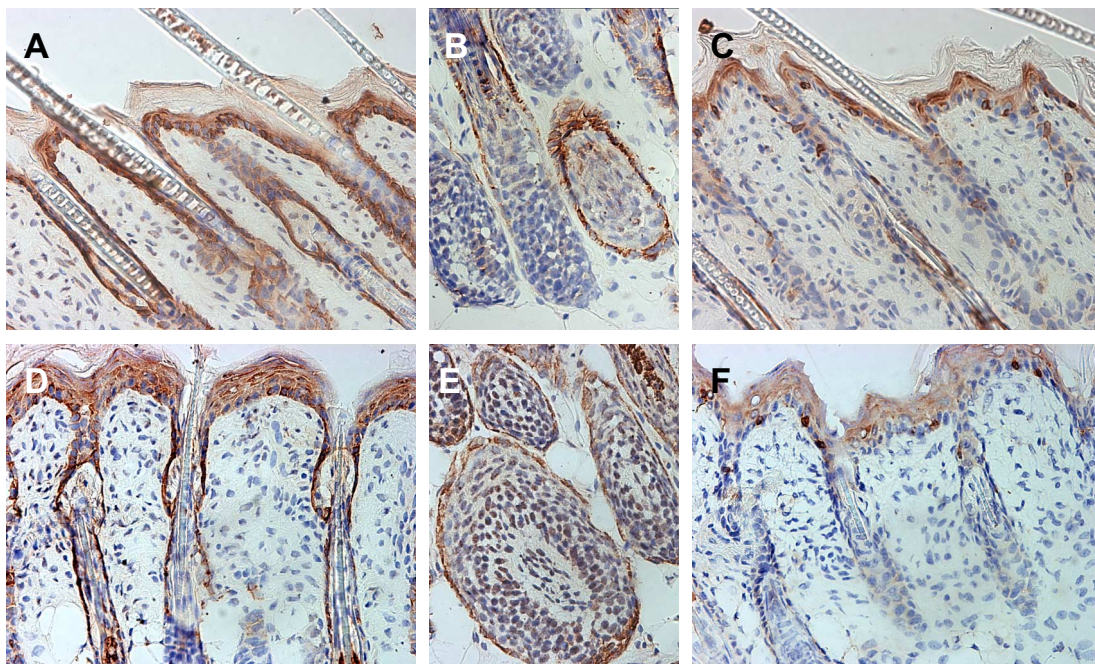


Abb. 31: Immunhistochemischer Nachweis der COX-Isoenzyme in der Haut von 9 Tage alten Wildtyp- (A-C) und transgenen Mäusen der Linie 675 (D-F)

Gezeigt sind Gefrierschnitte, die mit Anti-COX-2- (A-B, D-E) oder Anti-COX-1-Antikörpern (C, F) inkubiert worden waren.

Vergrößerung: 1:400

5.6 Talgdrüsenhyperplasie in COX-2-transgener Haut

Adulte transgene Mäuse fielen durch ihr fettiges, im Nackenbereich sogar stark verklebtes Fell auf. Wie die folgenden Untersuchungen ergaben, war dieser Phänotyp auf eine Talgdrüsenhyperplasie zurückzuführen.

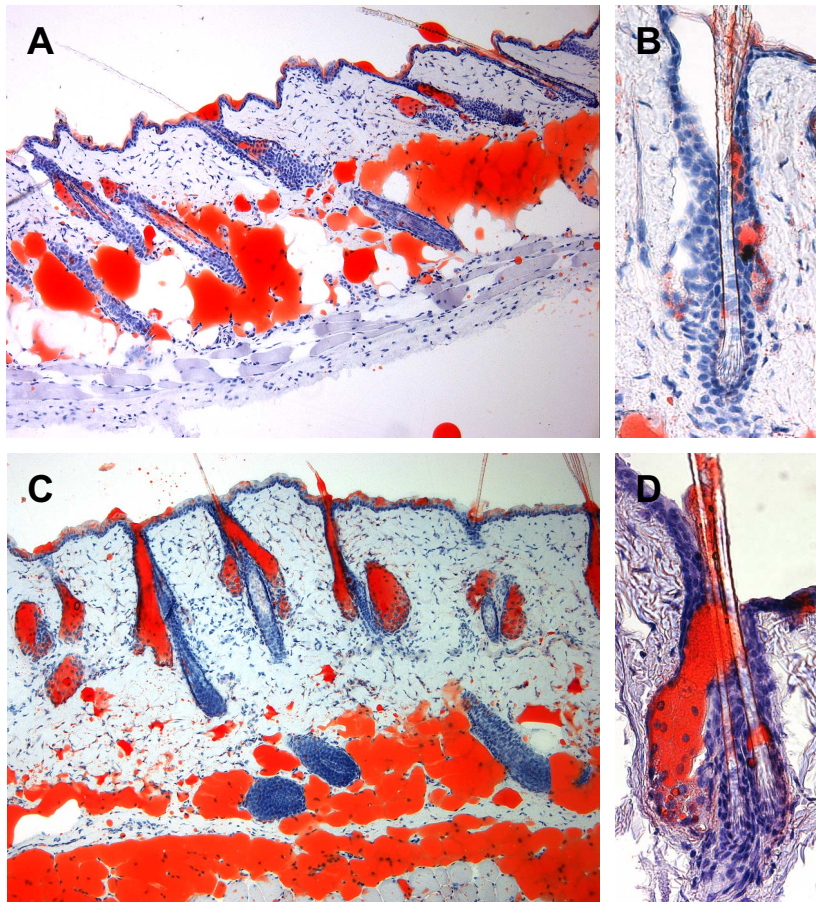


Abb. 32: Lipid-Akkumulation in der Rückenhaut von Wildtyp- und transgenen Mäusen

Gefrierschnitte von Wildtyp- (A, B) und transgener Rückenhaut 10 Monate alter Tiere (C, D) wurden in Formol-Calcium fixiert. Mit Oil Red O wurden die kutanen Lipide rot, die Zellkerne mit Hämatoxylin blau gefärbt.

(A) Wildtyp-Haut mit anagen-katagenen Haarfollikeln, (B) telogener wt Haarfollikel

(C) transgene Rückenhaut mit anagen-katagenen Haarfollikeln, (D) telogener tr Haarfollikel, Linie 667

Vergrößerungen: (A, C) 1:160, (B, D) 1:400

In mit Formol-Calcium fixierten Gefrierschnitten von Rücken- und Schwanzhaut wurden Lipide mit Oil Red O und Zellkerne mit Hämatoxylin gefärbt. In Abbildung 32 ist das Ergebnis für Rückenhaut von 10 Monate alten Tieren dargestellt. Danach waren die Talgdrüsen der transgenen Haut im Vergleich zum Wildtyp vergrößert. Auch die Menge an gespeichertem Lipid schien im Vergleich zu den Kontrollen erhöht. Die Talgdrüsenhyperplasie schien unabhängig vom Zyklus des assoziierten Haarfollikels zu sein, wie die Häute mit asynchronen Haarfollikeln zeigen.

Besonders ausgeprägt war die Talgdrüsenhyperplasie in transgener Schwanzhaut (Abb. 33). Hier waren die stark verzweigten Talgdrüsen die dominierende dermale Gewebekomponente und bedingten eine Verdopplung der dermalen Dicke. Die Rotfärbung des Str. corneums deutete auf eine Akkumulation von Sebum auf der Hautoberfläche.

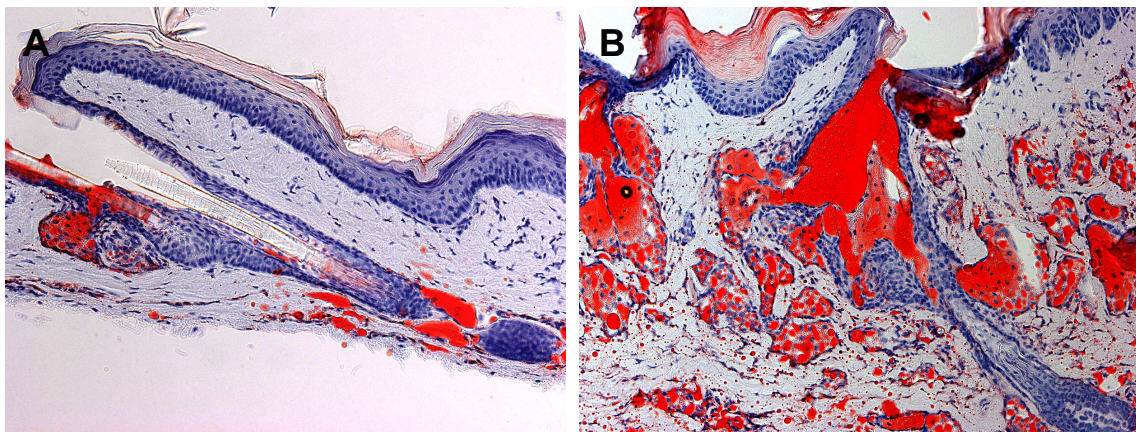


Abb. 33: Lipid-Akkumulation in der Schwanzhaut von Wildtyp- und transgenen Mäusen

Oil Red O-Färbung von Schwanzhaut 10 Monate alter Wildtyp- (A) und transgener Tiere (B) der Linie 667
Vergrößerung: 1:160

Die Talgdrüsen der Wildtyp-Schwanzhaut zeigten altersunabhängig die charakteristische Histologie mit zwei, aus talgproduzierenden Sebozyten bestehenden, Alveolen, die von einer einlagigen Epithelschicht basaloider Zellen peripher begrenzt wurden und einen gemeinsamen Ausführungsgang hatten.

Beim Wildtyp zeigte die Immunfluoreszenz-Färbung Keratin 5-Expression, wie erwartet, im einlagigen peripheren Talgdrüsenepithel der Alveolen und in den basalen Zellen des Talgdrüsenausführgangs, nicht aber in Sebozyten (Abb. 34 A). Der Talgdrüsenausführgang

wurde von einem stratifizierenden Epithel gebildet und mündete im Bereich des Infundibulums in den assoziierten Haarfollikel. In transgener Schwanzhaut wurden die Konturen der weitverzweigten Talgdrüsenalveolen, die sich um einen stark verbreiterten Talgkanal gruppierten, durch die Keratin 5-Färbung deutlich sichtbar. Das Keratin 5-positive Talgdrüsenepithel war, wie in Wildtyp-Haut, einlagig (Abb. 34 B).

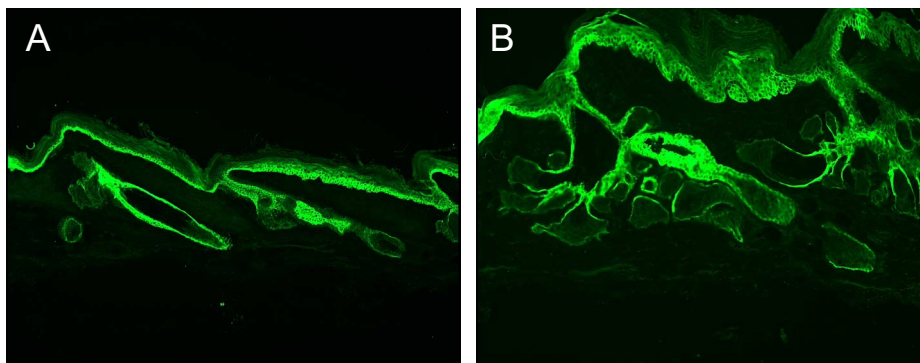


Abb. 34: Expression von Keratin 5 in Schwanzhaut

Schwanzhaut-Gefrierschnitte von 10 Monate alten Wildtyp- (A) und transgenen (B) Tieren wurden in Aceton fixiert und die Keratin 5-Expression durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem primären Keratin 5-spezifischen und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten sekundären Antikörper als grünes Fluoreszenzsignal nachgewiesen.

Vergrößerung: 1:160

Die altersabhängige Progression der Talgdrüsenhyperplasie wurde in HE-gefärbten Parafinschnitten von Schwanzhaut besonders deutlich (Abb. 35). Sie trat nach 3 Monaten erstmals in Erscheinung, nach 6 Monaten schienen die Alveolenlappen bereits vergrößert und nach 10 Monaten auch deren Anzahl vermehrt zu sein.

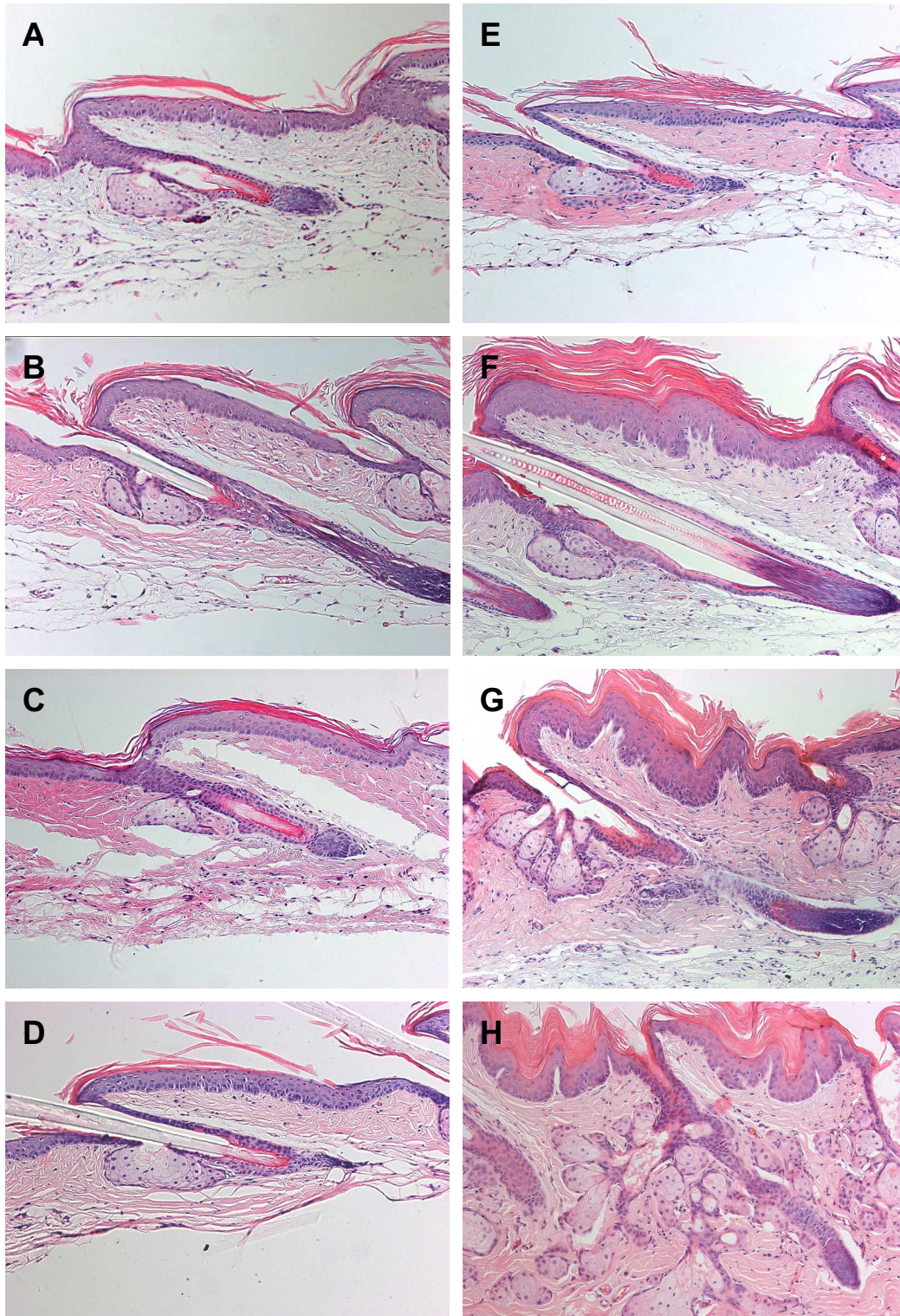


Abb. 35: Pathologische Veränderungen in COX-2-transgener Schwanzhaut: Altersabhängigkeit
HE-gefärbte Paraffinschnitte von Wildtyp- (A-D) und transgener (E-H) Schwanzhaut von Tieren der Linie 667.
(A, E) 7 Wochen, (B, F) 12 Wochen, (C, G) 6 Monate, (D, H) 10 Monate alte Tiere
Vergrößerung: 1:160

Die epikutane Talgakkumulation wurde in verschiedenen Körperregionen (Schwanz, Rücken und Nacken) mit einem Sebumeter photometrisch bestimmt (Abb. 36). In allen stark COX-2-überexprimierenden Linien (4, 667, 675) war sie gegenüber dem Wildtyp um mindestens einen Faktor 8 erhöht. Besonders im Nackenbereich wurde viel Sebum sezerniert. Die epikutanen Sebumkonzentrationen korrelierten mit dem Haarphänotyp der Tiere: wenig behaarte Mäuse mit stark fettig erscheinendem Haar wiesen die höchsten Werte auf.

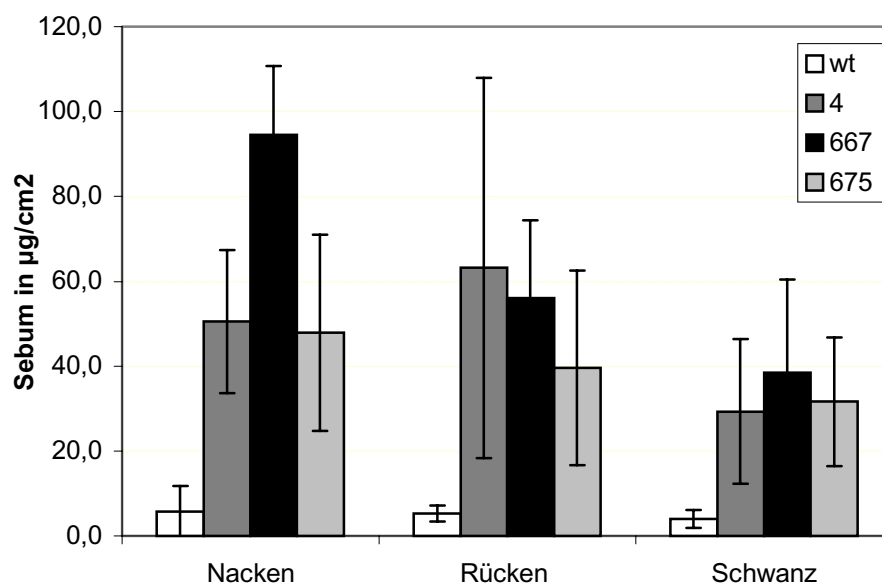


Abb. 36: Quantifizierung der epikutanen Sebumkonzentrationen

Bei 6 bis 10 Monate alten Wildtyp- ($n = 4$) und transgenen Tiere der Linien 4 ($n = 6$), 667 ($n = 3$), 675 ($n = 8$) wurden die epikutane Sebumkonzentration verschiedener Körperregionen mit dem Sebumeter SM 810 photometrisch bestimmt. Die Werte stellen Mittelwerte \pm SD dar.

Die immunhistochemische Anfärbung von Ki67 zeigte, daß sowohl im Wildtyp- als auch im transgenen Talgdrüsengewebe die basaloiden Zellen des peripheren, lipidfreien Epithels proliferierten, nicht jedoch die ausdifferenzierten Sebozyten. In holokrinen Drüsen korreliert die Sekretsynthese mit der Proliferationsrate des Epithels. Eine Auszählung der Ki67-positiven Zellen ergab in der Tat, daß im Wildtyp-Epithel $38,8 \pm 5,9$ %, in transgenem Talgdrüsenepithel von Tieren der Linie 667 $55,3 \pm 8,8$ % der basaloiden Zellen positiv waren. Diese signifikante Erhöhung der Proliferationsrate war repräsentativ für die Ki67-Färbung aller stark COX-2-exprimierenden transgenen Linien (Student's t-Test: $p \leq 0,0001$, $n = 4$ Serienschritte, Werte \pm SD).

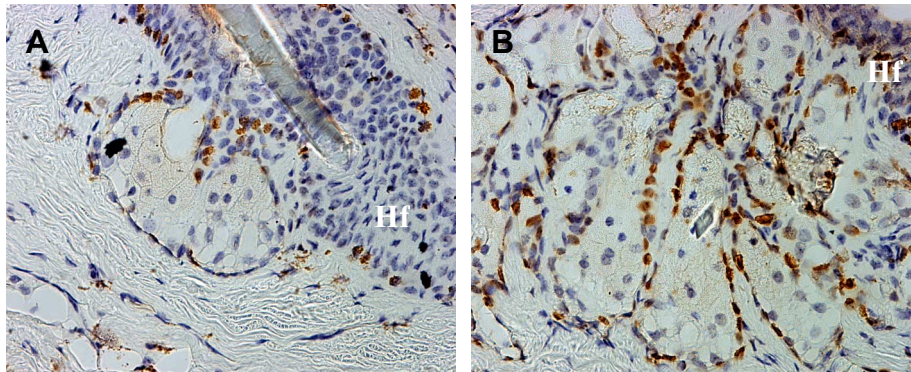


Abb. 37: Proliferationsaktivität in Talgdrüsenepithel transgener und Wildtyp-Schwanzhaut.

Mit Hilfe eines spezifischen Ki67-Antiköpers wurden proliferationsaktive Zellen im Talgdrüsenepithel immunhistochemisch markiert. (A) Schwanzhaut eines 10 Monate alten Wildtyp-Tieres; (B) Schwanzhaut eines 10 Monate alten transgenen Tieres. HF Haarfollikel

Vergrößerung: 1:400

5.7 Morphologische Veränderungen in Schwanzhaut von COX-2-transgenen Mäusen

5.7.1 Epidermale Hyperplasie

Anders als bei Bauch- und Rückenepidermis kommt es bei der Schwanzepidermis der Maus nicht zu einer postnatalen Verdünnung. Vielmehr handelt es sich hier auch bei erwachsenen Tieren um ein aus einer basalen Zellschicht und ca. 4 Lagen suprabasaler Zellschichten aufgebautes, verhornendes Plattenepithel, das alternierend in orthokeratotische (zellkernfreies Stratum corneum) und parakeratotische (zellkernhaltiges Stratum corneum) Abschnitte gegliedert ist (Schweizer et al., 1980).

Die parakeratotische interfollikuläre Schwanzepidermis K5-COX-2-transgener Tiere zeigte besonders auffällige pathologische Veränderungen. Bei 7 Wochen alten Tieren war eine Hyperkeratose zu erkennen (Abb. 35 E), die mit zunehmendem Alter immer ausgeprägter wurde. Zusätzlich kam es zu einer Hyperplasie der lebenden epidermalen Zellschichten (14 Wochen bis 10 Monate). Es bildete sich ein endophytisch wachsendes Epithel mit bis zu 10 Lagen von Keratinozyten. Diese Veränderungen sind exemplarisch in Abbildung 35 E-H dargestellt. Die Morphologie der Wildtyp-Epidermis blieb hingegen zwischen 7 Wochen

und 10 Monaten relativ konstant (Abb. 37 A-D). Histologische Untersuchungen mit den 10 Monate alten Founder-Tieren 667, 675 und 678 sowie eines 10 Monate alten Tieres der Linie 663 bestätigen diese Befunde (Abb. 38). Die endophytisch wachsende, papilläre epidermale Hyperplasie mit starker Hyperkeratose war in allen untersuchten Linien ausgeprägt. Bei transgenen Tieren schien das Basalzellkompartiment auf 2-3 Lagen ausgedehnt. In keinem Fall wurden Entzündungszellen in Dermis oder Epidermis beobachtet. Die epidermalen Hyperplasien wurden nur in Schwanz- und Ohr- nicht aber in Rückenhaut festgestellt. In den stratifizierenden Epithelien von Zunge, Vormagen und Ösophagus transgener Mäuse wurden gelegentlich milde Hyperplasien der lebenden Zellschichten beobachtet.

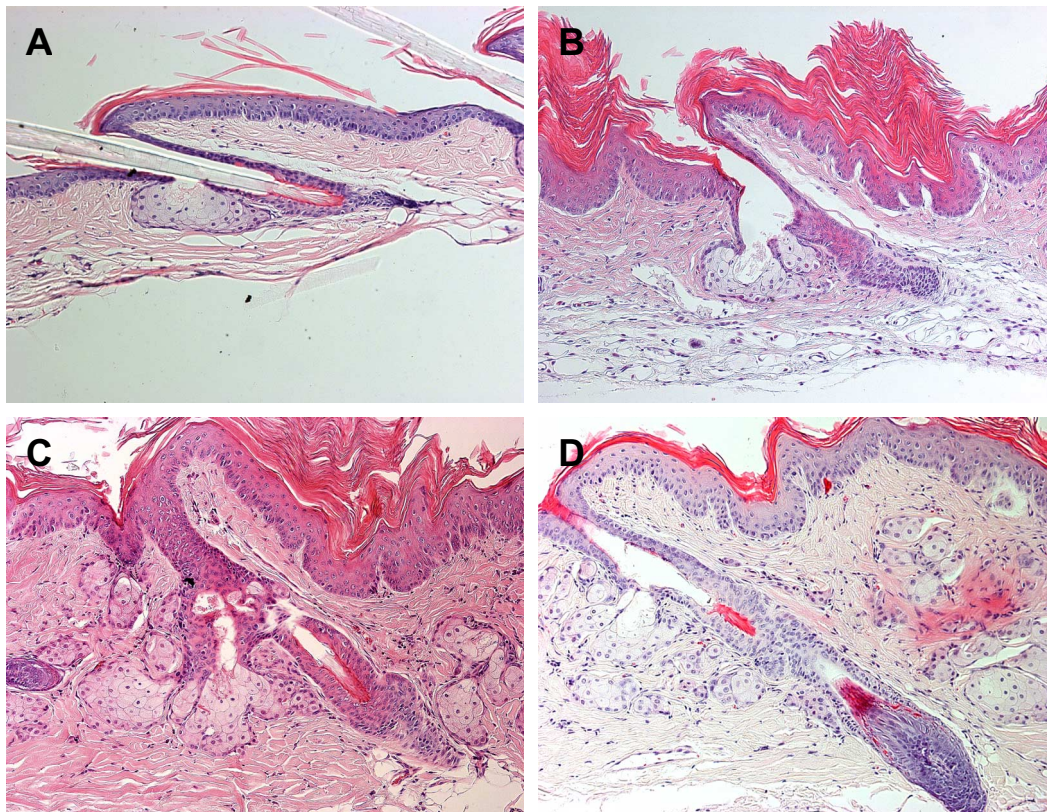


Abb. 38: Pathologische Veränderungen in der Schwanzhaut COX-2-transgener Mäuse

HE-gefärbte Paraffinschnitte von Schwanzhaut 10 Monate alter Wildtyp-Tiere (A) sowie Tieren der Linien 663 (B), 675 (C) und 678 (D).

5.7.2 Dysplastische Strukturen

Während in normaler Schwanzepidermis die Basalzellen palisadenartig mit ihrer Längsachse im rechten Winkel zur Basalmembran aufgereiht sind und im Laufe der terminalen Differenzierung parallel zur Basalmembran abflachen (Abb. 39 A), war diese Ordnung in transgener Epidermis fokal aufgehoben. Charakteristisch war neben der gestörten Orientierung der basalen Keratinozyten (deren Längsachse nun parallel zur Basalmembran lag) das Auftreten einzelner Keratinozyten mit großen Zellkernen. Diese dysplastischen Veränderungen traten bereits bei 7 Wochen alten Tieren auf (Abb. 39 B). Bei älteren Tieren waren größere dysplastische Herde mit endophytisch-papillomatösem Charakter sichtbar.

In der Schwanzhaut 3-10 Monate alter Tiere wurden papillomartige epidermale Wucherungen in die Dermis beobachtet, die aus bis zu 25 Keratinozytenschichten bestanden (Abb. 39 D-H). Auch Herde von gut differenzierten, in die Dermis invaginierenden, hyperplastisch-papilläre Strukturen mit großen Hornperlen waren sichtbar (Abb. 39 F-G). Wieder waren alle untersuchten transgenen Linien (663, 667, 675, 678) betroffen. In Wildtyp-Schwanzhaut wurden solche Veränderungen zu keinem Zeitpunkt beobachtet.

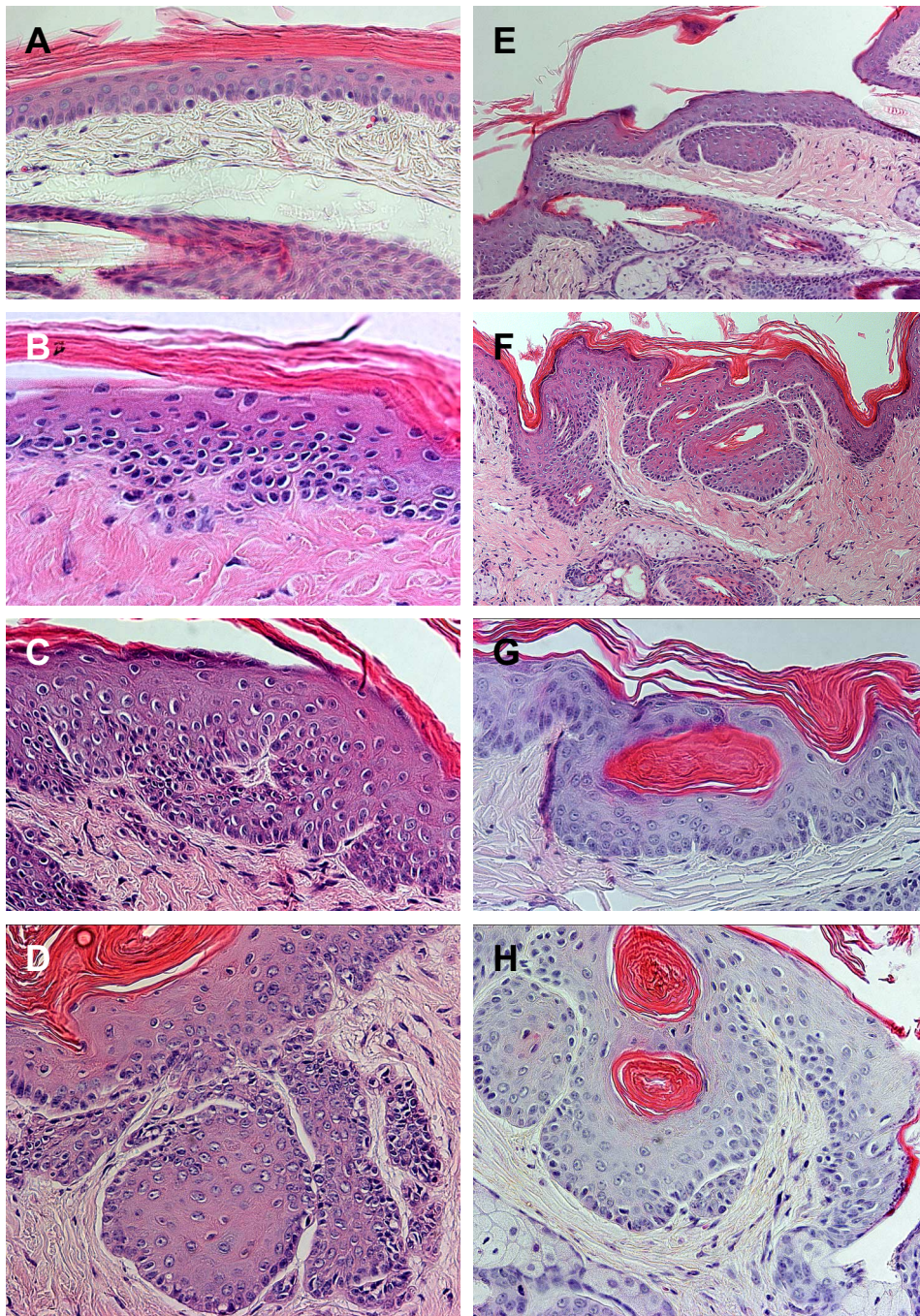


Abb. 39: Dysplastische Strukturen in der Schwanzhaut von COX-2-transgenen Mäusen

Paraffinschnitte transgener (B-H) und Wildtyp-Haut (A) wurden HE-gefärbt und die dysplastischen Areale der Epidermis aufgenommen.

Die Präparate stammen von (A) Wildtyp, 10 Monate, (B) 667, 7 Wochen, (C) 667, 12 Wochen, (D) 667, 10 Monate, (E) 675, 6 Monate, (F) 663, 6 Monate, (G) 675, 12 Wochen, (H) 663, 6 Monate.

Vergrößerungen: (A, C-H) 1:400, (B) 1:630

5.7.3 Proliferationsaktivität in interfollikulärer Epidermis

Die papilläre epidermale Hyperplasie in transgener Schwanzepidermis deutete auf eine Proliferationsstörung hin. Um die Proliferationsrate in Wildtyp- und transgener Epidermis zu ermitteln, wurde deshalb das in teilungsaktiven Zellen exprimierte Protein Ki67 immunhistochemisch nachgewiesen.

Die Auszählung der Ki67-positiven interfollikulären Zellen pro Gesichtsfeld ergab keinen signifikanten Unterschied: in Epidermis von Wildtyp-Tieren fanden sich $47,5 \pm 7,6 \%$, von 667-Tieren $43,3 \pm 4,6 \%$ und von 675-Tieren $44,5 \pm 7,5 \%$ Ki67-positive Zellen. Die Hyperplasie der transgenen Schwanzepidermis war daher nicht auf eine gesteigerte basale Zellteilungsaktivität zurückzuführen.

Allerdings unterschied sich die Lokalisation der Ki67-positiven Zellen in Wildtyp- und transgener Schwanzepidermis.

In Wildtyp-Epidermis waren sie, wie erwartet auf das basale Kompartiment beschränkt und nur vereinzelt epibasal nachzuweisen (Abb. 40 A, B). In transgener Epidermis waren dagegen viele Ki67-positive Zellen suprabasal lokalisiert, besaßen aber die charakteristische Morphologie einer Basalzelle und nicht die einer Stachelzelle (Abb. 40 D). Besonders in den hyperplastischen Lappen der Epidermis konzentrierten sich die Ki67-positiven Keratinozyten im suprabasalen Kompartiment (Abb. 40 D, F). Diese suprabasale Proliferationsaktivität wurde in allen untersuchten transgenen Linien beobachtet. Abbildung 40 zeigt exemplarisch die immunhistochemische Analyse für Tiere der Linien 4, 19, 667, 675 und 678.

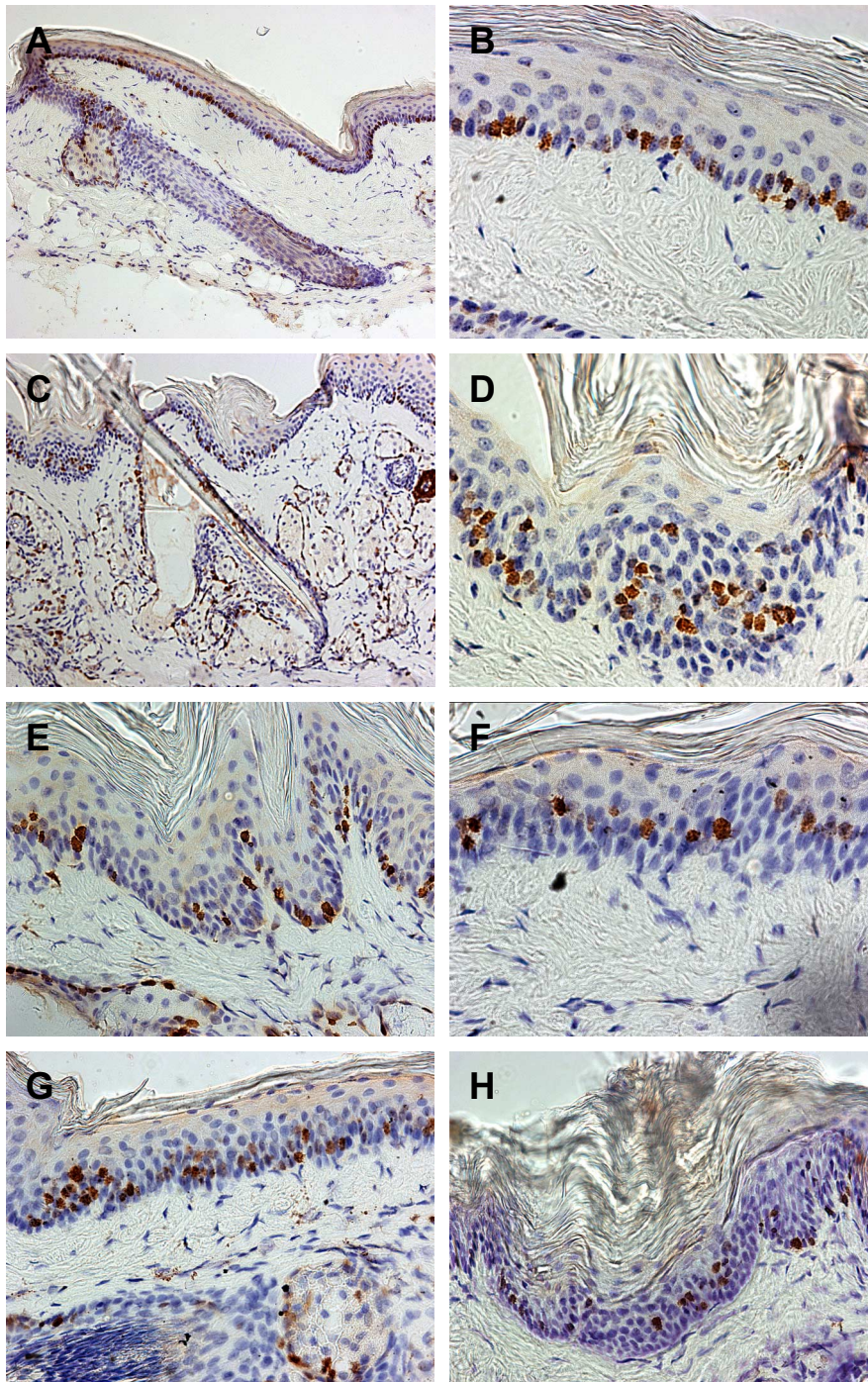


Abb. 40: Immunhistochemischer Nachweis von Ki67 in transgener und Wildtyp-Schwanzhaut

In Gefrierschnitten transgener und Wildtyp-Schwanzhaut 10 Monate alter Mäuse wurde das Ki67-Antigen mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen und die Zellkerne mit Hämatoxylin gefärbt.

(A, B) Wildtyp-, (C, D) 667-, (E) 678-, (F) 19-, (G) 4-, (H) 675-Tiere

Vergrößerungen: 1:160 (A, C), 1:400 (E, G, H), 1:630 (B, D, F)

5.7.4 Terminale Differenzierung der COX-2-transgenen Schwanzepidermis

Eine andere Ursache für die papilläre Hyperplasie in transgener Schwanzepidermis könnte eine verzögerte terminale Differenzierung sein. Um diese Frage zu beantworten, wurde bei 10 Monate alten transgenen Tieren der Linien 667, 675 und Wildtyp-Mäusen das Expressionsmuster der differenzierungsspezifisch von Keratinozyten gebildeten Strukturproteine Keratin 5, Keratin 10, Involucrin und Loricrin mittels Immunhistochemie oder indirekter Immunfluoreszenz untersucht (Abb. 41).

In parakeratotischer Wildtyp-Epidermis wurde Keratin 5 erwartungsgemäß nur in der Basalzellschicht (Abb. 41 A), Keratin 10 in den suprabasalen Keratinozyten (Abb. 41 B), Involucrin in den oberen Spinosumzellen (Abb. 41 C) und Loricrin nur in der obersten Spinosumschicht (Abb. 41 D) gefunden.

Transgene Mäuse exprimierten hingegen Keratin 5 nicht nur im Basalzellkompartiment, sondern in den hyperplastischen Epithellappen auch in bis zu 8 suprabasalen Zellschichten (Abb. 41 E). Diese teilweise im Bereich des oberen Str. spinosum lokalisierten Keratin 5-positiven Zellen besaßen keine Basalzell-Morphologie, sondern glichen eher Spinosumzellen.

Keratin 10 wurde in transgener Epidermis nicht im gesamten suprabasalen Kompartiment nachgewiesen. In manchen Arealen mit basaloid aussehenden Zellen fehlte jegliche Expression, in anderen Bereichen war sie deutlich vermindert. (Abb. 41 F).

Noch deutlichere Unterschiede wurden für Involucrin festgestellt (Abb. 41 G), welches nur noch in wenigen Zellen, zumeist im obersten Str. spinosum, gefunden wurde. Insgesamt wirkte das Expressionsmuster ungleichmäßiger als beim Wildtyp.

Für Loricrin wurden in transgener Epidermis ebenfalls schwächere Signale als in Wildtyp-Epidermis jedoch keine Unterschiede in der Lokalisation gefunden (Abb. 41 H).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die papilläre Hyperplasie und die starke Hyperkeratose in der Schwanzepidermis der transgenen Tiere die Folge einer verzögerten terminalen Differenzierung waren.

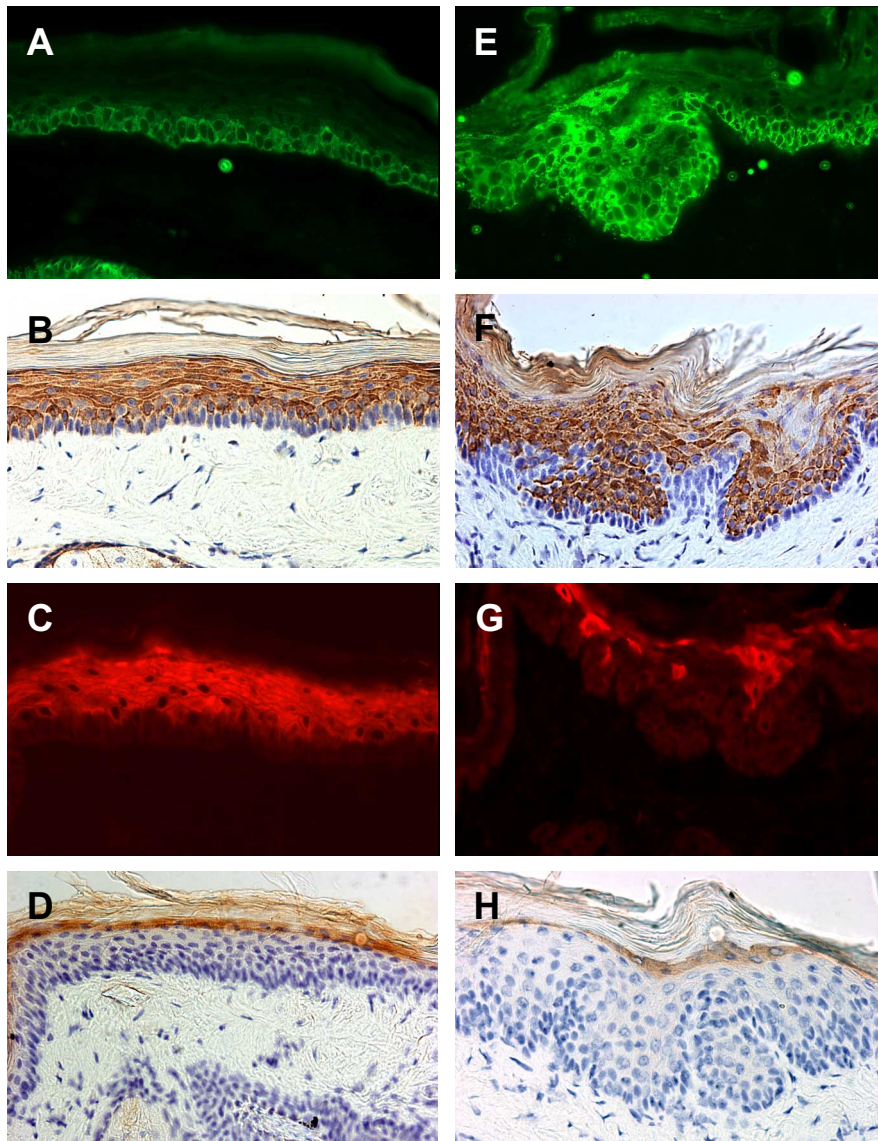


Abb. 41: Nachweis differenzierungsspezifischer Proteine in Keratinozyten von Wildtyp- und transgener Schwanzepidermis

Gefrierschnitte von Schwanzhaut 10 Monate alter Wildtyp- (A-D) und transgener Tiere der Linie 667 (E-H) wurden mit spezifischen Antikörpern gegen Keratin 5 (A, E), Keratin 10 (B, F), Involucrin (C, G) und Loricrin (D, H) behandelt und die Antigenbindung mittels Immunhistochemie (Keratin 10 und Loricrin) oder Immunfluoreszenz (Keratin 5 und Involucrin) detektiert.

Vergrößerung: 1:400

5.7.5 Blutgefäßdichte

Im Gegensatz zu Dermis und Subkutis enthält die Epidermis im Normalfall keine Blutgefäße, sondern wird vom subepidermalen Gefäßplexus mit diffundierenden Nährstoffen und Sauerstoff versorgt.

Eine ausreichende Versorgung durch Diffusion ist nur bis zu einer kritischen Gewebegröße möglich. Dies gilt auch für Tumore. Es stellte sich die Frage nach der Versorgung der endophytisch-papillär wachsenden Hyperplasien in transgener Schwanzhaut. Deshalb wurde die Blutgefäßverteilung in Schwanzhaut 10 Monate alter Wildtyp- und transgener Tiere mit Hilfe eines Antikörpers gegen CD31 (auch als PECAM-1 bekannt), einem charakteristischen Oberflächenprotein von Endothelzellen immunhistochemisch analysiert.

Beim Wildtyp wurden auf diese Weise Blutgefäße in der Subkutis und der Dermis lokalisiert (Abb. 42 A, B). Im Bereich der Dermis umgaben die CD31-positiven Endothelzellen die Haarfollikel und die assoziierten Talgdrüsen. Im Vergleich dazu schien die dermale Blutgefäßdichte in transgener Schwanzhaut erhöht. Dies war besonders im subepidermalen Bereich unmittelbar in der Nähe der hyperplastischen Papillen und der hyperplastischen Talgdrüsen ausgeprägt. Im Bereich der papillären Strukturen zogen CD31-exprimierende Endothelzellstränge bis in das obere Stratum papillare zwischen die Epidermiszapfen (Abb. 42 F). Diese Beobachtung wurde für alle transgenen Linien mit hyperplastischer Schwanzepidermis gemacht.

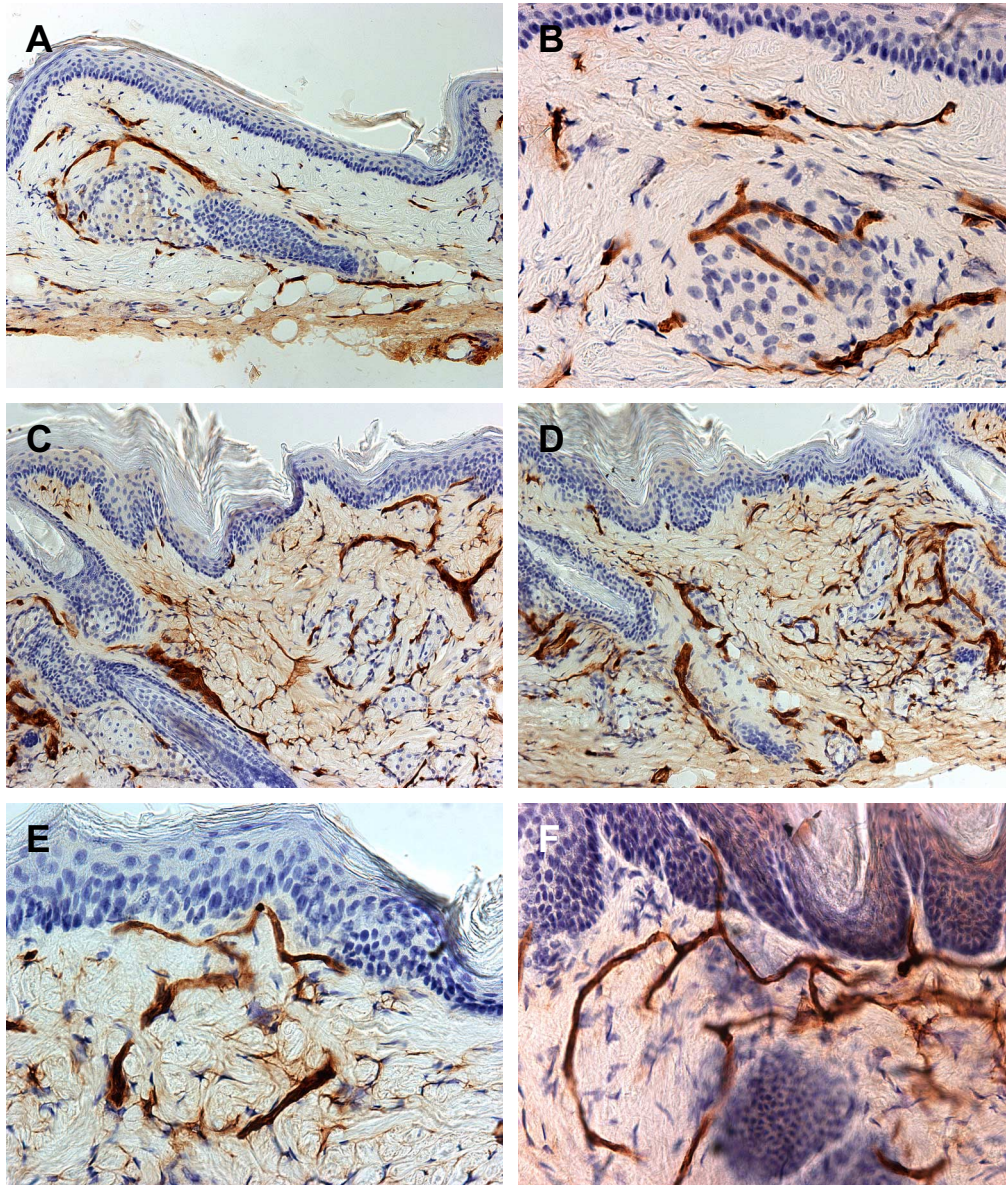


Abb. 42: Immunhistochemischer Nachweis des Endothelzellproteins CD 31 in transgener und Wildtyp-Schwanzhaut

Mit einem polyklonalen gegen CD31 gerichteten Antikörper wurden in der Schwanzhaut 10 Monate alter Wildtyp- (A, B) und transgener Tiere verschiedener Linien (C-F) die Endothelzellen der Blutgefäße markiert. (C, D) Linie 667, (E) Linie 4, allerdings nur 12 Wochen, (F) Linie 675

Vergrößerungen: (A, C-D) 1:160, (B, E-F) 1:400

5.7.6 Haarfollikelanomalien

Haarfollikel sind in der Schwanzhaut regelmäßig zwischen den parakeratotischen und orthokeratotischen Abschnitten angeordnet.

In der Schwanzhaut transgener Mäuse traten ab dem 3. Lebensmonat vermehrt Haarfollikel mit atypischer Morphologie auf. Besonders betroffen waren Tiere der Linie 663, die bis zu 50% anormale Haarfollikel aufwiesen.

Diese Veränderungen betrafen den zyklisierenden Teil des Haarfollikels, also die Haarzwiebel bis zum Ansatzpunkt des Musculus arrector pili (Abb. 43 A-F). Beobachtet wurden z.B. laterale Sprossungen aus der Haarzwiebel. Die vorwiegend basaloid erscheinenden Keratinozyten waren säulenartig um eine gemeinsame Längsachse angeordnet. Mit Ki67-Immunhistochemie (Abb. 43 J-L) wurden in diesen Bereichen proliferierende Keratinozyten detektiert. Dies wies auf ein Auswachsen hin. Außerdem fanden sich Auffächerungen des unteren Haarfollikelabschnittes bis hin zur Ausbildung zweier separater, differenziert wirkender Haarfollikelabschnitte, die in einen gemeinsamen Isthmus- und Infundibulumbereich mündeten.

In einigen der lateralen Auswüchse waren differenzierte Haarfollikelstrukturen erkennbar (Abb. 43 C). In Immunfluoreszenz-Präparaten mit Keratin 5-Antikörper tauchten Haarfollikelstrukturen auf, die entweder von einer gemeinsamen äußeren Wurzelscheide umschlossen waren (43 I), oder die zwei distale Haarfollikelabschnitte ausbildeten (43 H). In Wildtyp-Schwanzhaut (43 A, G, J) wurden solche morphologisch veränderten Haarfollikel nicht beobachtet.

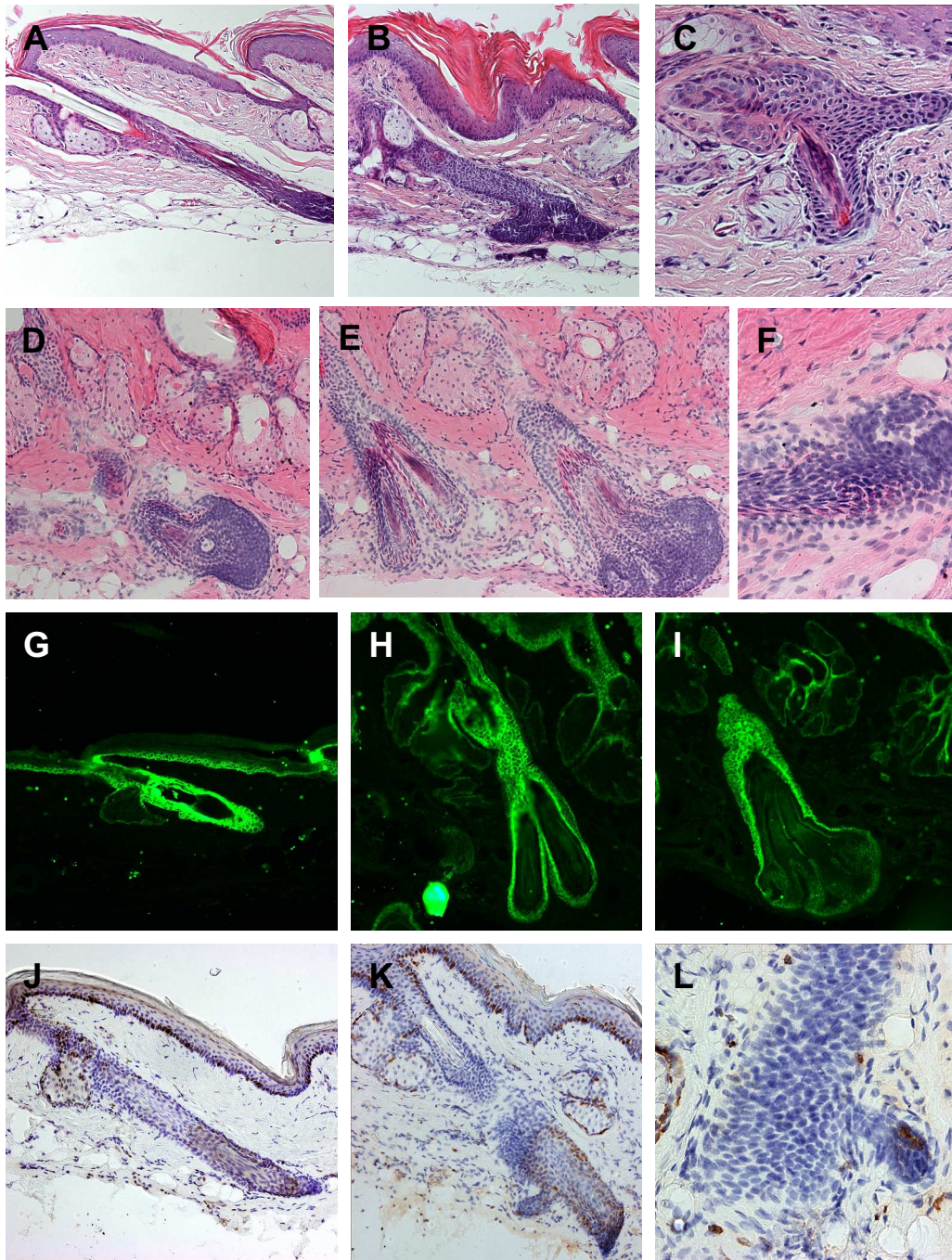


Abb. 43: Haarfollikel mit atypischer Morphologie in der Schwanzhaut von COX-2 transgenen Mäusen

(A-F) HE-Färbungen von Wildtyp (A) transgener Schwanzhaut (Linie 663, 6 Monate)

(G-I) Keratin 5-Immunfluoreszenz, (G) wt, 6 Monate, (H, I) Linie 663, 10 Monate

(J-L) Ki67-Immunhistochemie (J) wt, 6 Monate, (K, L) Linie 663, 6 Monate

Vergrößerungen: (A-B, D-E, G-K) 1:160, (C, F, L) 1:630

5.8 Effekte von COX-2-Inhibitoren auf den transgenen Phänotyp

Um herauszufinden, ob der Phänotyp der COX-2-transgenen Mäuse auf COX-2-Überaktivität zurückzuführen war, wurden Experimente mit selektiven COX-2-Inhibitoren durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden NMRI-Weibchen mit einem homozygoten Männchen der Linie 667 verpaart. Unmittelbar nach der Geburt der Jungtiere wurde damit begonnen, die Muttertiere mit selektiven COX-2- (Inhibitor 1, Inhibitor 2) zu füttern. Die Inhibitoren waren einer Nagerdiät mit 1500 ppm (Inh 1) bzw. 500 ppm (Inh 2) zugesetzt, die von Dr. K. Seibert (Searle-Pharmacia) zur Verfügung gestellt wurde. Nach dem Absetzen der 4 Wochen alten Jungtiere wurden diese weiterhin mit dem Inhibitor-haltigen Futter ernährt. Je eine Gruppe transgener und Wildtyp-Tiere wurde mit Kontrolldiät gefüttert.

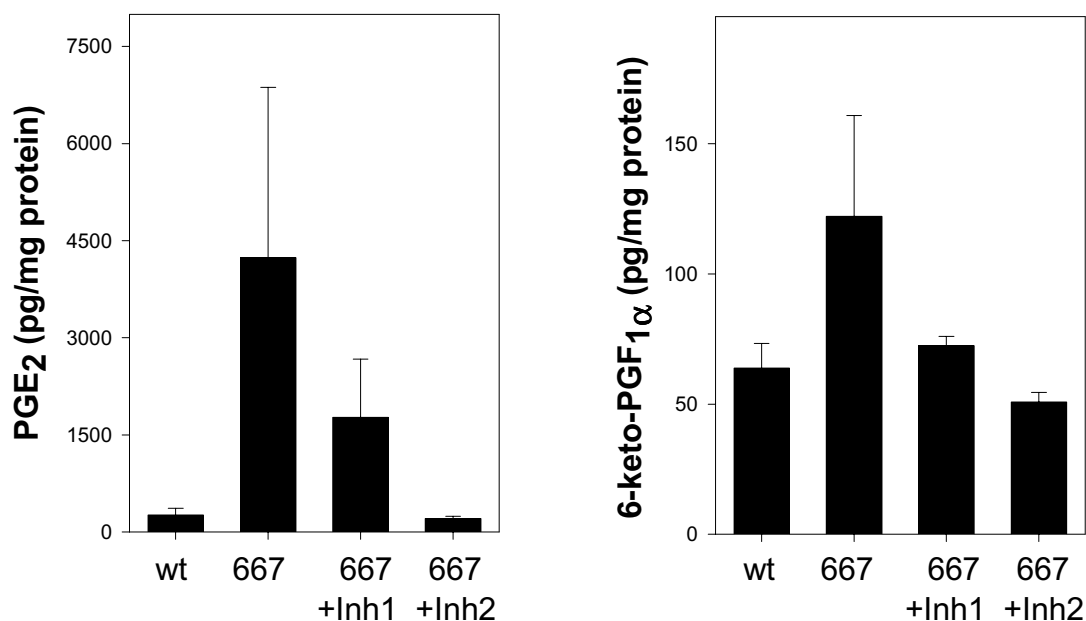


Abb. 44: Einfluß von COX-2-Inhibitoren auf die Prostaglandin-Konzentration in Schwanzhaut von transgenen Mäusen

Transgene Mäuse (Linie 667) wurden ab Geburt – wie im Text beschrieben – mit Kontrollfutter oder einem mit den COX-2-Inhibitoren 1 (1500 ppm) oder 2 (450 ppm) versetzten Futter ernährt. Wildtyp-Tiere (wt) erhielten nur Kontrollfutter. Nach 12 Wochen wurden die Tiere getötet, die Schwanzhaut pulverisiert und die Lipide ethanolisch extrahiert. Nach Anreicherung der Prostaglandinfraktion durch Festphasenextraktion an C₁₈-Silicasäulen wurden die PGE₂- (A) und 6-Keto-PGF_{1α}-Konzentrationen (B) mittels Enzym-Immuno-Assay quantifiziert.

Angegeben sind Mittelwerte \pm SD (n = 3).

Im Alter von 12 Wochen wurden die Auswirkungen dieser Diät analysiert. Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen der Inhibitoren wurde den narkotisierten Mäusen retrobulbär Blut entnommen; die Quantifizierung erfolgte durch Dr. Ben Zweifel (Pharmacia/Searle, Shokie, IL, USA). Anschließend wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet.

Abbildung 44 zeigt die in der Schwanzhaut gemessenen Konzentrationen an PGE_2 und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$. Die transgenen Kontroll-Tiere wiesen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ca. 10-fach erhöhte PGE_2 - und ca. 2-fache erhöhte 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentrationen auf.

Bei mit Inhibitor 1-gefütterten transgenen Tieren war die PGE_2 -Menge nur halb so hoch wie bei mit Kontrolldiät gefütterten Transgenen, bei Inhibitor 2-gefütterten Mäusen lag die PGE_2 -Menge sogar auf Wildtyp-Niveau. Auch die 6-Keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ -Konzentrationen bei Inhibitor-gefütterten transgenen Tieren entsprachen denen von Wildtyp-Tieren.

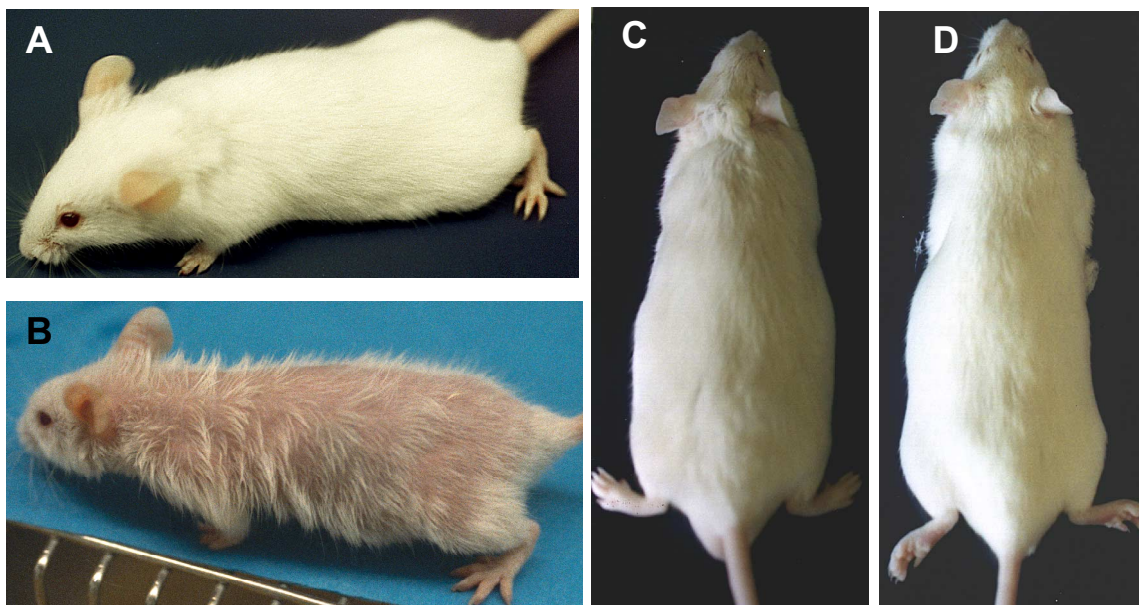


Abb. 45: Effekt von COX-2-Inhibitoren auf des Haarkleid der COX-2-transgenen Tiere

(A) 12 Wochen alte Wildtyp-NMRI-Maus, (B) 12 Wochen alte transgene Maus der Linie 667, transgene Mäuse der Linie 667 mit COX-2-Inhibitor 1 (C) bzw. mit COX-2-Inhibitor 2 (D) gefüttert. Einzelheiten s. Abb. 44.

Die verringerte Menge von Prostaglandinen nach Inhibitorapplikation korrelierte mit einer nahezu vollständigen Unterdrückung des transgenen Phänotyps (Abb. 45). Das Haarkleid der mit Inhibitor 1 behandelten Tiere (Abb. 45 C) war deutlich dichter als bei transgenen Kontrolltieren (Abb. 45 B). Die dem Inhibitor 2 ausgesetzten Transgenen waren äußerlich nicht mehr von Wildtyp-Tieren zu unterscheiden (Abb. 45 D).

Auch die histologische Untersuchung der Schwanzepidermis zeigte, daß die transgene Epidermis nach Inhibitor-Behandlung eher Wildtyp-Charakter hatte.

So fand sich bei Inhibitor 1-behandelten Tieren nur noch eine leichte Hyperplasie und die Hyperkeratose war auf haarfollikelnahe Bereiche beschränkt (Abb. 46 C). Inhibitor 2 unterdrückte die Hyperplasie nahezu vollständig (Abb. 46 D) und auch ein endophytisch-papilläres Wachstum der Epidermis wurde nicht mehr beobachtet. Des weiteren waren keine Hornperlen oder dysplastischen Strukturen mehr zu erkennen.

Die Rückbildungen des transgenen Phänotyps war von einer eher normal wirkenden terminalen Differenzierung der Epidermis begleitet. Dies zeigten Immunfluoreszenz-Analysen von Keratin 5 und Involucrin (Abb. 47). Keratin 5 wurde in der Schwanzepidermis Inhibitor-behandelter Transgene, wie in Wildtyp-Epidermis, hauptsächlich nur noch von basalen Keratinozyten exprimiert. Auch die suprabasale Involucrin-Expression entsprach dem Wildtyp-Muster. In allen Fällen stellte sich Inhibitor 2 als die effizientere der beiden Verbindungen heraus.

Die transgene COX-2-Expression im Basalkompartiment der Epidermis, in der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels und in den Basalzellen der Talgdrüsen wurde durch die Inhibitor-Behandlung nicht beeinflußt.

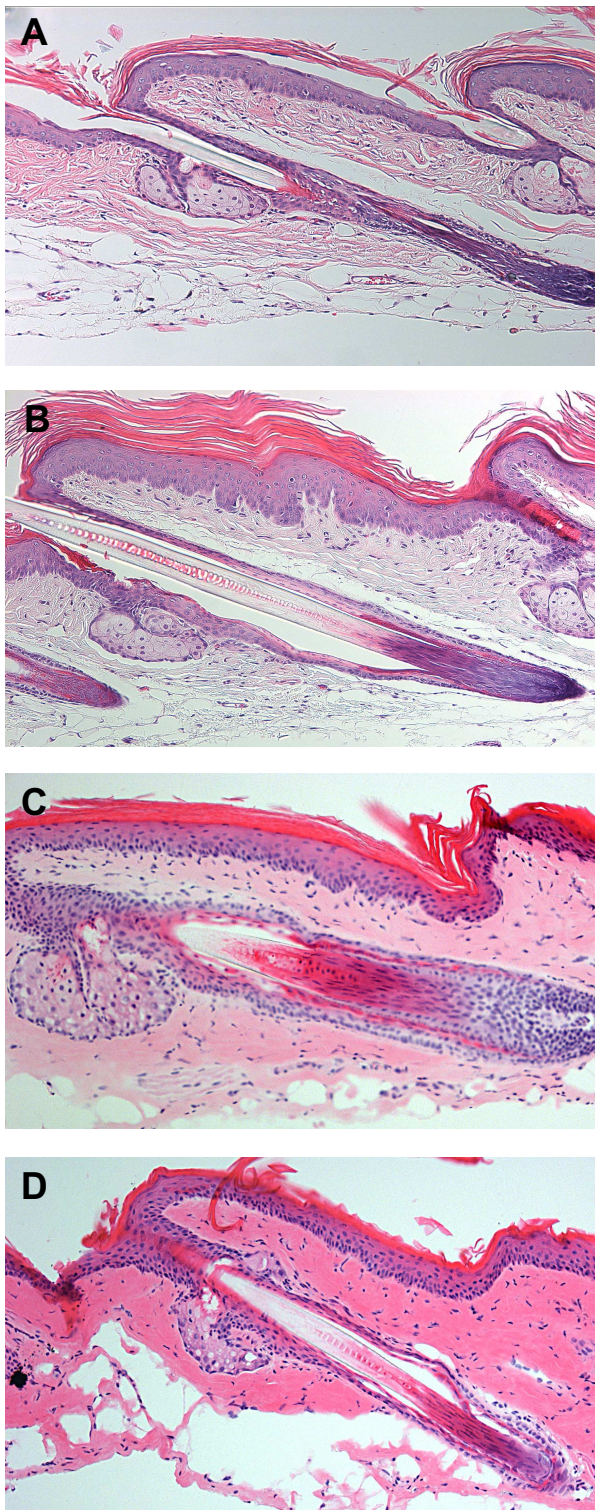


Abb. 46: Einfluß von selektiven COX-2-Inhibitoren auf die Morphologie der transgenen Schwanzepidermis

HE-gefärbte Gefrierschnitte von 12 Wochen alten Wildtyp-Tieren (A) sowie Tieren der transgenen Linie 667 ohne (B) oder mit Behandlung mit Inhibitor 1 (C) bzw. Inhibitor 2 (D).

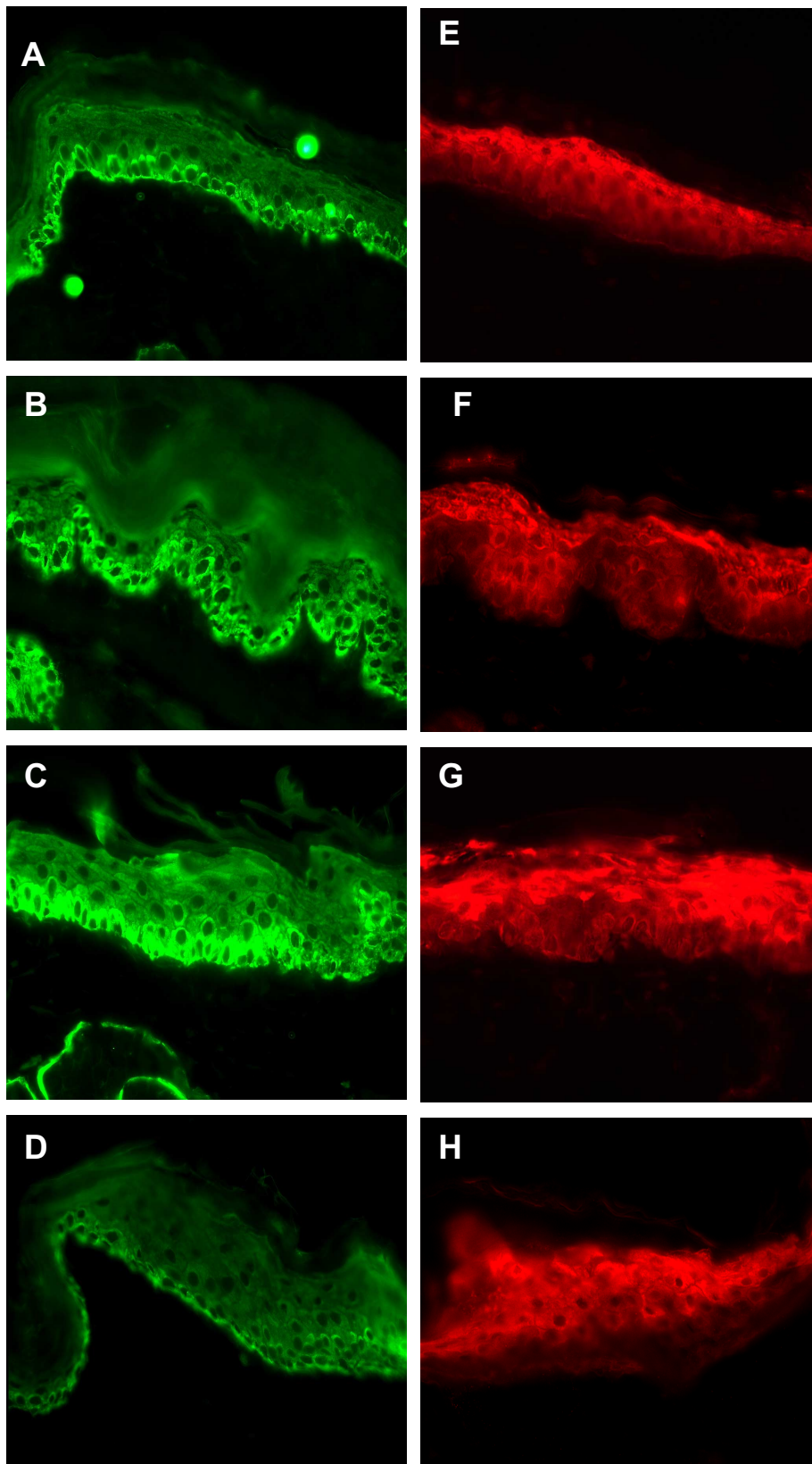


Abb. 47: Einfluß von COX-2-Inhibitoren auf die Expression von Keratin 5 und Involucrin in transgener Schwanzhaut

Immunfluoreszenznachweis von Keratin 5 (A-D) und Involucrin (E-H) in Gefrierschnitten von 12 Wochen alten Wildtyp-Tieren (A, E) sowie Tieren der transgenen Linie 667 ohne (B, F) oder mit Behandlung mit Inhibitor 1 (C, G) bzw. Inhibitor 2 (D, H).

5.9 Ohrödemtest

COX-2 gilt als inflammatorisches Notfallenzym und in einigen Geweben sind die über den COX-2-Weg synthetisierten Prostaglandine am Ablauf von Entzündungsreaktionen beteiligt. Charakteristische Symptome einer entzündlichen Reaktion sind Rötung, Erwärmung und Schwellung des Gewebes. Letztere entsteht durch eine erhöhte Blutgefäßpermeabilität. In der Haut wird ein entzündliches Ödem u.a. durch Verwundung oder chemische Reizung, z.B. durch die topische Applikation des Tumorpromotors TPA oder von Arachidonsäure, ausgelöst.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die transgene Überexpression von COX-2 einen Einfluß auf entzündliche Prozesse in der Maushaut hatte. Zu diesem Zweck wurde durch TPA oder Arachidonsäure ein Ohrödem induziert, ein üblicher Test zur Erfassung der Hautreaktion auf entzündliche Reize (Gschwendt et al., 1984). Dabei ist ein maximaler Effekt von TPA nach 6 h und von Arachidonsäure nach 2 h zu beobachten.

8 Wochen alten Männchen wurden acetonische Lösungen von 330 mmol Arachidonsäure oder 1 nmol TPA jeweils auf beide Ohren aufgetragen und die Ödembildung durch Auswiegen von Ohrstanzen analysiert. Als Kontrollen dienten topisch mit Aceton behandelte Tiere. Diese Tests wurden mit transgenen Tieren der Linien 4 und 667 sowie deren gleichaltrigen Wildtyp-Brüdern durchgeführt.

5.9.1 Ödeme in unbehandelten Ohren

Es fiel auf, daß transgene Kontrolltiere stets höhere Ohrgewichte aufwiesen als ihre gleichaltrigen Wildtyp-Geschwister, nämlich $15,7 \pm 0,8$ mg gegenüber $18,0 \pm 1,0$ mg ($p \leq 0,0001$, Student's t-Test, $n = 10$ Tiere, \pm SD).

Um zu untersuchen, ob diese Gewichtszunahme auf eine konstitutiv gesteigerte Gefäßpermeabilität zurückzuführen war, wurden Versuchstieren 150 µl einer sterilfiltrierten, isotonischen Evans-Blau-Lösung (2% w/v) in die Schwanzvene injiziert und der Austritt des Farbstoffes ins Gewebe nach 30 min gemessen (Abb. 48).

In transgener Ohrhaut war das kutane Gefäßgeflecht deutlich dunkelviolett zu sehen. Außerdem wurde bei allen transgenen Tieren in der Ohrperipherie punktuell der Austritt von Evans-Blau beobachtet. Bei Wildtyp-Ohren wurden insgesamt weniger intensiv angefärbte Gefäße und kein Austritt von Farbstoff in das umliegende Gewebe beobachtet.

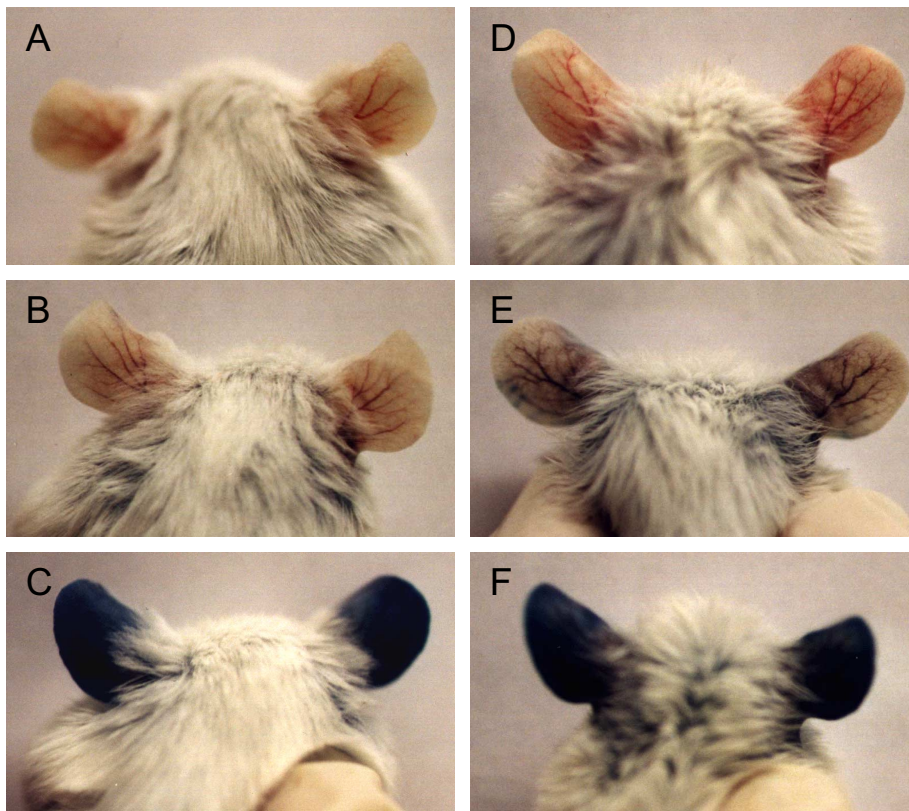


Abb. 48: Permeabilität der kutanen Blutgefäße in Wildtyp- (A-C) und COX-2-transgenen Mäusen (D-F)

8 Wochen alten Tieren wurden 150 μ l einer 2% Evans-Blau-Lösung (in isotonischer Kochsalzlösung) intravenös injiziert. Die Abbildung zeigt die Farbstoffverteilung in unbehandelten und 6 h mit 1 nmol TPA behandelten Ohren 30 min nach Injektion.

(A, D) Negativkontrolle: isotonische Kochsalzlösung statt Evans Blau (B, E) mit Evans-Blau; (C, F) Positivkontrolle: 6 h TPA mit Evans-Blau,

Histologische Untersuchungen der Ohren ergaben keine Hinweise auf eine epidermale Hyperplasie oder Veränderungen im übrigen Gewebe. Die höheren Ohrgewichte bei transgenen Tieren und die leichte Evans-Blau Anfärbung der Ohren weisen daher auf eine erhöhte Gefäßpermeabilität hin.

5.9.2 Ödeme in stimulierten Ohren

Eine Behandlung der Ohren mit Arachidonsäure führte sowohl bei transgenen als auch bei Wildtyp-Mäusen zur Ausbildung eines etwa gleichstarken Ödems. Das Gewicht der Ohrstanzen nahm um durchschnittlich 75% zu (Abb. 49).

Ein anderes Ergebnis zeigte sich für TPA. Bezogen auf die Aceton-Kontrollwerte betrug hier der ödembedingte Anstieg des Gewebegewichtes das 2-2,5-fache bei Wildtyp-Mäusen, jedoch nur das 1,6-1,8-fache bei transgenen Mäusen.

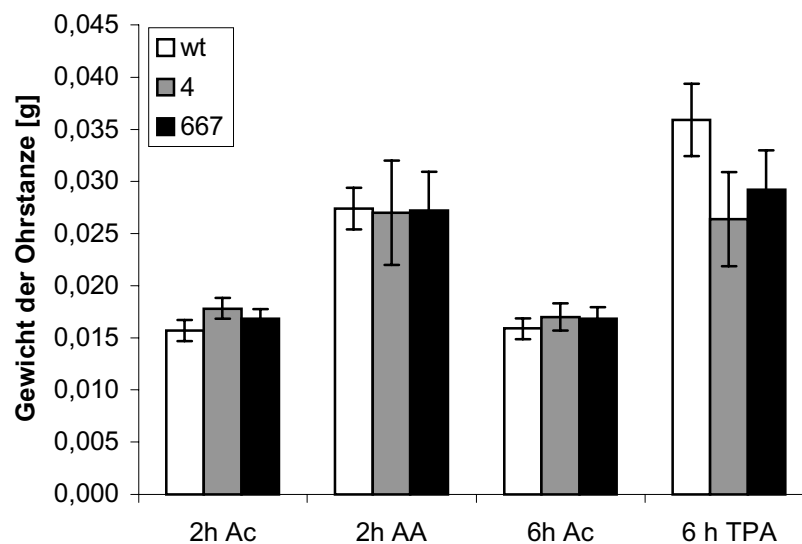


Abb. 49: Induktion eines Ohrödems bei COX-2-transgenen Mäusen und Wildtyp-Tieren durch Arachidonsäure und TPA

8 Wochen alte Wildtyp-Tiere (wt) und Geschwistern der Linien 667 und 4 wurden topisch mit 1 nmol TPA pro Ohr oder 330 nmol Arachidonsäure (AA), gelöst in 10 μ l Aceton, behandelt. Kontrolltiere erhielten nur Aceton (Ac). Nach 2 bzw. 6 h wurde die Ödembildung durch Auswiegen von Ohrstanzen gemessen. Pro Versuchsgruppe wurden 4 Tiere (8 Ohren) behandelt.

Die Dosis-Wirkungskurven der TPA-induzierten Ödembildung waren in Wildtyp- und transgenen Tieren im Verlauf vergleichbar, wobei die halbmaximale Reaktion mit ca. 0,18 nmol und eine maximale Reaktion mit 1 nmol erreicht wurde (Abb. 50 A). Allerdings waren die gemessenen Gewichtszunahmen bei hohen TPA-Konzentrationen ($\geq 0,5$ nmol) in transgenen Ohren erneut schwächer als in Wildtyp-Ohren.

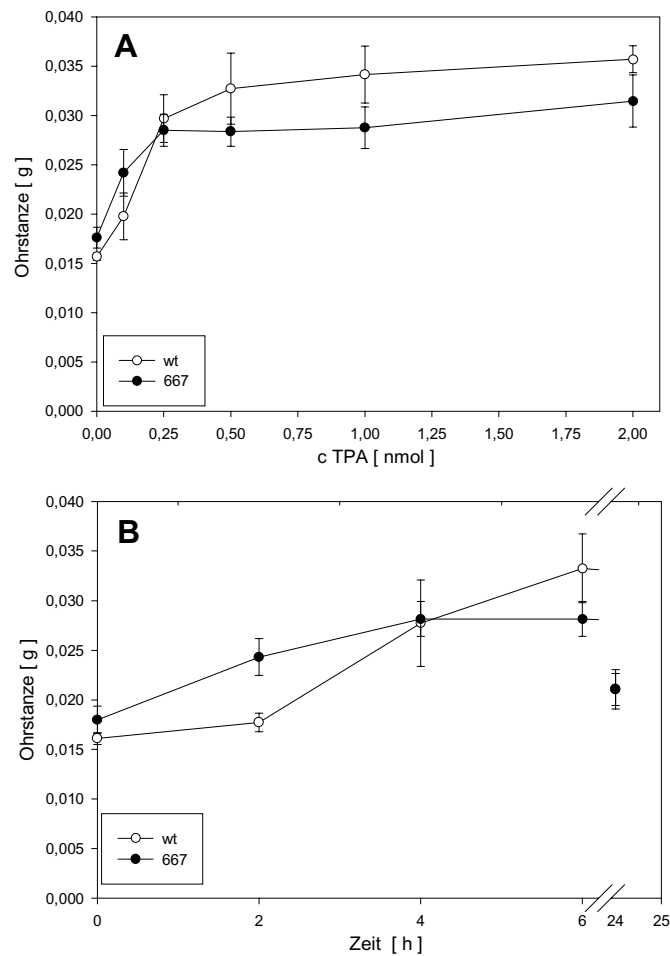


Abb. 50: TPA-induzierte Ödembildung in Ohren von Wildtyp- und transgenen Mäusen

(A) Dosis-Wirkungs-Kurve

Beide Ohren von Transgenen und Wildtyp-Brüdern wurden mit TPA-Konzentrationen von 0,1 bis 2 nmol behandelt. Nach 6 h wurde das Ausmaß der Ödembildung quantifiziert ($n = 3$, \pm SD).

(B) Kinetik

Transgenen Tieren der Linie 667 sowie Wildtyp-Brüdern wurde jeweils 1 nmol TPA pro Ohr topisch aufgetragen und die Ödembildung nach 2, 4, 6 und 24 h untersucht ($n = 3$, \pm SD).

Im zeitlichen Ablauf der Ödementwicklung bei TPA-behandelten Tieren (1 nmol) zeigten sich signifikante Unterschiede in der Anfangsphase der Reaktion (Abb. 50 B). Wie für Wildtyp-Mäuse publiziert, wurde auch in diesen Versuchen nach einer 2-stündigen Lag-Phase die halbmaximale Reaktion nach 4 h und die maximale Reaktion auf TPA 6 h nach Behandlungsbeginn registriert. In transgenen Ohren setzte die Ödembildung vergleichsweise schneller ein, d.h. 2 h nach TPA-Applikation war bereits mehr als die halbmaximale, 2 h später bereits die maximale Ödembildung zu verzeichnen. 24 h nach TPA-Applikation war die Ödembildung unabhängig vom Genotyp abgeklungen.

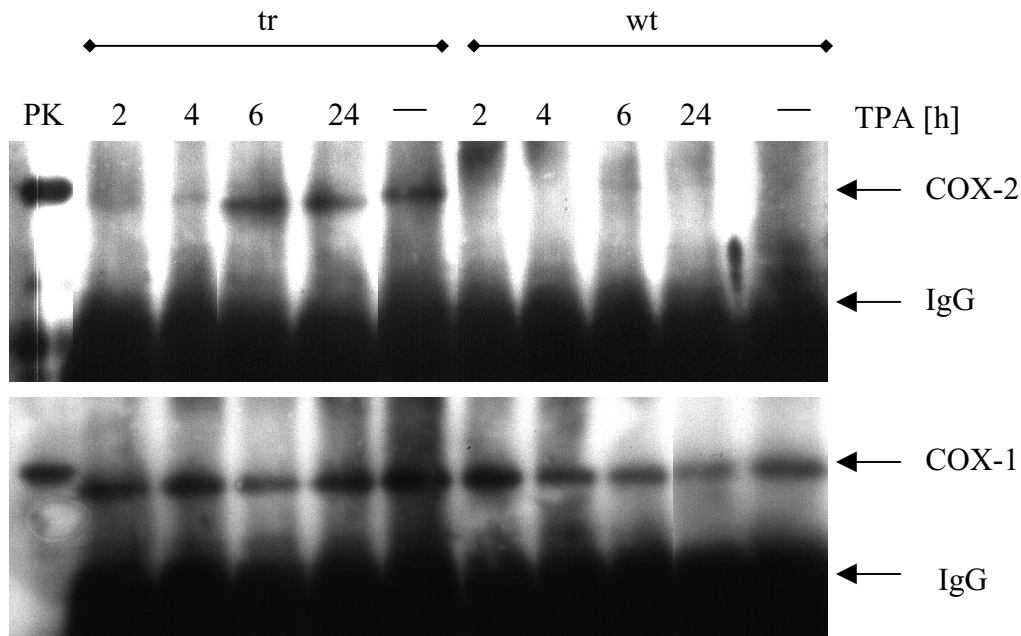


Abb. 51: Auswirkung einer TPA-Behandlung auf die COX-Isoenzymexpression in den Ohren von Wildtyp (wt) und COX-2-transgenen (tr) Mäusen

Die Ohren von transgenen und Wildtyp-Mäuse 1 nmol TPA behandelt und die Ödembildung nach 2, 4, 6 und 24 h untersucht. Kontrolltiere wurden 24 h nach Aceton-Applikation analysiert. Die ausgestanzten Ohrstücke wurden homogenisiert und anschließend die COX-Isoenzyme sequenziell immunpräzipitiert und im Immunblot nachgewiesen. Zellysate aus PDV-Keratinocyten wurden als Positivkontrollen aufgetragen (PK, Spur 1).

(A) COX-2-Immunblot, (B) COX-1-Immunblot
IgG Immunglobulin G aus der Immunpräzipitation

In Immunblot-Analysen von immunpräzipitierten COX-Isoenzymen (Abb. 51) war in Aceton-behandelten Wildtyp-Ohren COX-2 nicht nachweisbar und wurde auch nicht durch TPA-Behandlung induziert. Dagegen war COX-2 auch in Ohren sowie in Schwanz- und Rückenhäuten der transgenen Tiere exprimiert. Die TPA-Behandlung führte zu keiner weiteren Verstärkung des COX-2-Immunsignals. Die COX-1-Isoenzymexpression war in allen Proben vergleichbar.

Transgene Tiere reagierten folglich auf eine Applikation von TPA, nicht jedoch von Arachidonsäure, mit einer schwächeren Ödemreaktion, die allerdings schneller einsetzte als bei gleichaltrigen Wildtyp-Geschwistern.

5.10 Effekt des K5-COX-2-Transgens auf die Induktion von epidermalen Tumoren

Epidermale Tumorgenese wurde durch die sequentielle epikutane Behandlung der Mausehaut mit einer Einzeldosis des Karzinogens DMBA (Initiation) und wiederholter Behandlung mit dem Phorbolester TPA (Promotion) ausgelöst. Die Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe ($n = 20$) garantierte ein Ergebnis von statistischer Signifikanz.

Tab. 6: Tumorentwicklung in der Haut von K5-COX-2-transgenen (Linie 667) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nach einer einzelnen epikutanen Applikation von 100 nmol DMBA

Stamm	<i>nach 16 Wochen</i>		<i>nach 24 Wochen</i>		<i>nach 30 Wochen</i>	
	Inzidenz	Ausbeute	Inzidenz	Ausbeute	Inzidenz	Ausbeute
tr	0	0	14	0,1	29	0,6
wt	0	0	0	0	0	0

Bei Wildtyp-NMRI-Mäusen führte eine alleinige DMBA- (Tab. 6, zweite Zeile) oder TPA-Behandlung zu keinen Papillomen. Die kombinierte Behandlung erzeugte dagegen in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer und der Dosis des Tumorpromotors (Tab. 7) eine signifikante Tumorantwort gemessen als Tumorzinzidenz (Anzahl der Tumorträger/überlebende Tiere) und Tumor-Ausbeute (Anzahl der Papillome/überlebende Tiere).

Tab. 7: Tumorentwicklung in der Haut von K5-COX-2-transgenen (Linie 667) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen im Initiations-Promotionsexperiment

Stamm	TPA-Dosis	<i>nach 16 Wochen</i>		<i>nach 24 Wochen</i>		<i>nach 30 Wochen</i>	
		Inzidenz	Ausbeute	Inzidenz	Ausbeute	Inzidenz	Ausbeute
tr	2,5 nmol	11	0,2	47	0,9	67	1,3
	5 nmol	47	2,1	76	3,8	82	4,1
wt	2,5 nmol	40	0,9	65	1,9	65	2,3
	5 nmol	68	3,3	94	5,2	83	4,6

100 nmol DMBA wurden zum Zeitpunkt Null auf die Rückenhaut aufgetragen. 1 Woche später wurde die TPA-Behandlung (angegebene Dosis, 2 x wöchentlich) begonnen und über den angegebenen Zeitraum fortgesetzt.

Anders als beim Wildtyp wurde bei transgenen Mäusen durch die DMBA-Initiation allein eine signifikante Papillombildung ausgelöst (Tab. 6). Nach kombinierter DMBA/TPA-Behandlung von transgenen Mäusen der Linie 667 wurde nach 30 Wochen Versuchsdauer eine ähnliche Inzidenz und Ausbeute von Papillomen wie bei Wildtyp-Mäusen erhalten. Die Tumorentwicklung bei transgenen Mäusen war jedoch deutlich verzögert und erreichte erst nach 24 Wochen Werte, die bei Wildtyp-Mäusen schon nach 16 wöchiger Behandlung gemessen wurden (Tab. 7). Die dargestellten Ergebnisse geben den Stand der Tumorexperimente bis 30 Wochen nach Versuchsbeginn wieder. Eine abschließende Analyse, insbesondere der Karzinomentwicklung, steht noch aus.

6 Diskussion

Genetische und pharmakologische Evidenzen belegen einen kausalen Zusammenhang zwischen der aberranten Expression und Aktivität von COX-2 und epithelialer Tumorentwicklung. Dies gilt auch für Tumore der Epidermis, deren stufenweise Entwicklung im Modell der Mehrstufenkarzinogenese in der Maushaut nachgestellt werden kann. Auch hier wurden in früheren Studien die deregulierte, konstitutive COX-2 Expression und die massive Akkumulation von Prostaglandinen als frühe tumorspezifische Veränderungen gefunden. Eine transiente Expression von COX-2 ist typisch für jede Art von Hautschädigung und kann modellhaft durch die epikutane Einwirkung von Phorbolestern ausgelöst werden. Um die Funktion der Expression von COX-2 in Epidermis *in vivo* zu analysieren, wurden transgene Mäuse hergestellt, die dieses Protein unter Kontrolle des Keratin 5-Promotors im basalen Epidermiskompartiment konstitutiv exprimieren, und die phänotypischen Auswirkungen der aberranten Expression in normaler, geschädigter Haut und bei der epidermalen Tumorentwicklung charakterisiert.

6.1 Charakterisierung der K5-COX-2 transgenen Linien

Mit Hilfe des Keratin 5-Promotors werden Zielgene spezifisch im basalen Kompartiment von stratifizierenden Epithelien exprimiert (Blessing et al., 1987). In der Haut exprimieren neben den basalen Keratinozyten der interfollikulären Epidermis, die Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide des Haarfollikels und die Zellen des peripheren Talgdrüsenepithels Keratin 5. In allen untersuchten K5-COX-2-transgenen Linien wurde diese Expression von COX-2-Protein für die Epidermis von Rücken-, Bauch-, Schwanz-, und Ohrhaut bestätigt. Das transgene mRNA-Transkript war außerdem, wie zu erwarten, in den stratifizierenden Epithelien von Zunge, Vormagen und Ösophagus nachweisbar. Des weiteren wurde die transgene mRNA in der Lunge gefunden. Dies könnte auf die Keratin 5-Expression in trachealem Gewebe zurückzuführen sein (Moll et al., 1982). Bei Tieren der Linie 4 wurde die mRNA des K5-COX-2-Konstrukts außerdem auch im Gehirn nachgewiesen, obwohl für dieses Gewebe bisher keine K 5-Promotoraktivität beschrieben wurde.

In den sieben heterozygot transgenen Mauslinien wurden nach statistischer Analyse der F₁- und F₂-Generation keine signifikanten Auswirkungen der K 5-gesteuerten COX-2-Expression auf die Fertilität männlicher und weiblicher Mäuse sowie keine embryotoxischen Effekte beobachtet. Sowohl Wurfgröße als auch Geschlechtsverteilung der Nachkommen unterschieden sich nicht von Wildtyp-Tieren. Außer bei Linie 678 wurde das transgene Konstrukt den Mendelschen Regeln entsprechend an die Nachkommen vererbt. Dies schließt eine parallele Integration der transgenen DNA auf mehreren Loci aus.

Auch die Zucht homozygoter Tiere der Linien 19, 667 und 675 war erfolgreich. Alle bisher getesteten homozygoten Männchen und Weibchen waren fertil. Der prozentuale Anteil an homozygoten Nachkommen aus der Heterozygot x Heterozygot-Verpaarung lag allerdings deutlich unter den zu erwartenden 25%. Ob dies auf eine erhöhte embryonale Letalität oder auf eine lückenhafte Identifizierung der potentiell homozygoten Tiere zurückzuführen war, ist zur Zeit noch unklar.

Die transgenen Mäuse fielen in der Regel durch ein leicht vermindertes Körpergewicht auf. Dies könnte durch eine schlechtere Nahrungsverwertung bedingt sein. Ob es sich dabei um einen systemischen Effekt der erhöhten PGE₂-Konzentration im Blut handelt, ist noch unklar.

Einige heterozygote Mäuse starben vorzeitig an Pankreatitis. Da in pankreatischem Gewebe weder eine K 5-gesteuerte, noch eine endogene COX-2-Expression beobachtet wurde, wird vermutet, daß die erhöhten PGE₂-Plasmaspiegel dafür verantwortlich waren. Aus systemischen Effekten könnten auch die diagnostizierten Wucherungen der Bulbourethral-Drüse, die renalen Pathologien (milde Glomerulonephritis, Hydronephrose) sowie die entzündliche Peribronchitis resultieren. Letztere könnte aber auch direkt durch die Überexpression von COX-2 in der Lunge bedingt sein.

Besonders auffallend war das verstärkte Krallenwachstum der transgenen Tiere. Nägel sind epidermale Anhangsorgane und weisen einen spezialisierten Keratinisierungsprozess auf, der im Gegensatz zur epidermalen Differenzierung ohne die Synthese von Keratohyalin granula abläuft (Scher und Daniel, 1990; Hashimoto, 1971a). Das harte Keratin der Nagelplatte wird von der Nagelmatrix, einem mehrschichtigen, aus proliferierenden, basalen Zellen bestehenden Epithel gebildet (Hashimoto, 1971b). Eine aberrante Expression von COX-2 in dieser Wachstumszone könnte für das verstärkte Nagelwachstum verantwortlich sein.

Wichtig für transgene Tiermodelle ist es, einen kausalen Zusammenhang zwischen phänotypischer Veränderung und Transgen-Aktivität sowie die Unabhängigkeit von unspezifischen Parametern wie Integrationsort der transgenen DNA-Sequenz oder dem gewählten genetischen Hintergrund nachzuweisen (Greenhalgh et al., 1996; Schlegel, 1997).

Die beschriebenen phänotypischen Veränderungen wurden in allen transgenen Linien beobachtet. Damit kann ein bestimmender Einfluss des Integrationsorts weitgehend ausgeschlossen werden. Außerdem waren die phänotypischen Merkmale unabhängig davon, ob die transgenen Tiere vom Stamm NMRI oder B6D2F1 herrührten.

In der Haut sind die Keratinozyten die Hauptproduzenten von Prostaglandinen. Sie synthetisieren bei der Maus hauptsächlich PGE₂ und PGF_{2α}. Die transgenen Mäuse wiesen 5- bis 8-fach höhere PGE₂- und PGF_{2α}-Konzentrationen in der Epidermis verschiedener Körperregionen wie Ohr-, Rücken- und Schwanzhaut als die Wildtyp-Geschwistertiere auf. Der Anstieg der Prostaglandin-Konzentrationen korrelierte mit der Transgen-Expression und

war im wesentlichen auf die konstitutive, K 5-gesteuerte COX-2-Expression in diesen Geweben zurückzuführen. Darüber hinaus war in Keratin 5-positiven Epithelien wie Epidermis, Zunge und Vormagen neben der transgenen auch die endogene COX-2-mRNA nachweisbar.

Die Induktion der endogenen COX-2 ist vermutlich die Folge der erhöhten PGE₂-Bildung. Sowohl die COX-2-Expression als auch in geringerem Umfang die COX-1-Expression, können in Keratinozyten durch extrazelluläres PGE₂ stimuliert werden (Maldve et al., 2000). PGE₂ entfaltet seine Wirkung hierbei über spezifische Oberflächenrezeptoren vom EP2- und EP4-Subtyp, die über zyklisches AMP und Proteinkinase A die Expression von COX-2 aktivieren (Pilbeam et al., 1995; Takahashi et al., 1994; Inoue und Tanabe, 1998). Diese „feed-forward“-Stimulation der Prostaglandin-Synthese ist auch für Osteoblasten, Osteosarkomazellen, Prostatakarzinomzellen und Makrophagen gezeigt worden (Murakami et al., 1997; Wong et al., 1997b; Pang und Hoult, 1997; Tjandrawinata et al., 1997).

Obwohl COX-2 bereits bei niedrigen Arachidonsäure-Konzentrationen katalytisch aktiv ist (Smith et al., 2000), ist eine vermehrte Bereitstellung des Substrates für eine gesteigerte Prostaglandin-Bildung essentiell. Dafür ist die Aktivierung von Mitgliedern der PLA₂-Enzymfamilie notwendig, die die Freisetzung der in Membranphospholipiden verestert vorliegenden Arachidonsäure katalysieren (Balsinde et al., 1999; Lambeau und Lazdunski, 1999). Es gibt Hinweise auf eine wechselseitige Beeinflussung von PLA₂ und COX. Diese Wechselwirkungen hängen von vielen Faktoren wie Zeitpunkt nach erfolgter Reizung, intrazelluläre Calciumkonzentration oder Art des externen Stimulus ab. In humanen embryonalen Nierenzellen ist nur COX-2, nicht aber COX-1, in der Lage, die cPLA₂-vermittelte Arachidonsäure-Freisetzung zu induzieren (Murakami et al., 1999). Umgekehrt wurde eine parakrine COX-2-Induktion durch extrazelluläre Bindung von sPLA₂ beschrieben (Murakami et al., 1999; Murakami et al., 1996).

In Keratinozyten wurden cPLA₂ und sPLA₂ vom Typ I, IIA und V nachgewiesen (Kast et al., 1993; Li-Styles et al., 1998; Schadow et al., 2000). Vorläufigen Experimenten zufolge war die cPLA₂-Expression in transgener Haut nicht erhöht.

Neben der Arachidonsäure-Freisetzung ist die zelltypspezifische Umwandlung des durch COX gebildeten Prostaglandins H₂ zu PGE₂ und PGF_{2α} durch Prostaglandin-Synthasen und -Isomerasen für die Regulation der Prostaglandinausschüttung von Bedeutung (Martin und Ullrich, 1999). Zwei Glutathion-abhängige Prostaglandin E₂-Synthasen sind charakterisiert worden, die sich bezüglich zellulärer Lokalisation, Expressionsmuster und Interaktion mit COX-1 und -2 unterscheiden (Murakami et al., 2000; Tanioka et al., 2000; Jakobsson et al., 1999; Forsberg et al., 2000). Während die cytosolische, konstitutive Isoform bevorzugt durch COX-1 gebildetes PGH₂ zu PGE₂ umsetzt, interagiert die induzierbare, Membran-assoziierte Isoform mit COX-2. Es bleibt zu klären, ob die gesteigerte PGE₂-Produktion bei den COX-2-transgenen Tieren mit einer Induktion der membran-assoziierten PGE₂-Synthase korreliert.

6.2 Einfluß der konstitutiven COX-2-Expression auf Entzündungsprozesse in der Haut

Entzündungsprozesse gehen mit einer vorübergehend erhöhten Synthese von Prostaglandinen einher, die als lokale Mediatoren wirksam werden. So stimuliert PGE₂ die Vasodilatation, die Blutgefäßpermeabilität sowie die Synthese proinflammatorischer Cytokine und wird von den Entzündungszellen auch selbst produziert (Gilroy et al., 1999). Die Folgen von Vasodilatation und erhöhter Gefäßpermeabilität sind Rötung (Erythem) und Schwellung (Ödem) der betroffenen Hautregion. Die Ödembildung wird als Maß für entzündliche Hautreaktionen verwendet. COX-2 wird aufgrund seiner raschen Induzierbarkeit durch proinflammatorische Mediatoren und der anti-inflammatorischen Wirkung von selektiven COX-2 Hemmstoffen eine Schlüsselrolle bei akuten und chronischen Entzündungen zugeschrieben (Tomilson et al. 1994; Vane et al., 1994; Masferrer et al., 1994; Crofford et al., 1994). In Übereinstimmung mit diesem Konzept waren die Ohren transgener Tiere leicht gerötet und ödematös. Dies zeigte sich durch ein im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen signifikant erhöhtes Ohrgewicht, sowie durch einen verstärkten Austritt von Evans-Blau aus den kutanen Blutgefäßen. Dennoch war keine durchgehende Korrelation zwischen COX-2-Expression und entzündlichen Veränderungen, z.B. in der Rücken- und Schwanzhaut, zu beobachten. Auch war keine leukozytäre Infiltration zu erkennen. Daher scheinen die konstitutive Expression von COX-2 und die erhöhte Prostaglandin-Synthese keine hinreichende Bedingung für Hautentzündungen zu sein.

Die durch Arachidonsäure ausgelöste Ödembildung im Mausohr verlief in Wildtyp- und transgenen Mäusen identisch. Die maximale Antwort wurde zwei Stunden nach Applikation erreicht und war somit unabhängig von der transgenen COX-2-Expression. In Übereinstimmung damit zeigten COX-2-knock-out-Mäuse nach Arachidonsäure-Behandlung keine gegenüber Wildtyp-Mäusen verminderte Ödembildung, während die Ausschaltung der COX-1 die Ödembildung um 70% reduzierte (Langenbach et al., 1995). In Maushaut werden daher Entzündungsreaktionen, bei denen es zu einer schnellen Freisetzung von Arachidonsäure kommt oder die durch freie Arachidonsäure ausgelöst werden, eher durch COX-1 als durch COX-2 reguliert.

Komplexer verläuft die TPA-induzierte Entzündungsreaktion. Ein COX-1- oder COX-2-Knock-out hatte auf sie keinen Einfluß (Langenbach et al., 1995; Morham et al., 1995; Dinchuk et al., 1995). Wurde die Ohrhaut von K5-COX-2-transgenen Tieren mit niedrigen TPA-Konzentrationen behandelt, so kam es schneller zu einem Ödem, das jedoch insgesamt schwächer ausfiel. Der schnelle Eintritt der Entzündungsreaktion in transgener Ohrhaut ist vermutlich die Folge der konstitutiven COX-2, die schon bei niedrigen Konzentrationen von freier Arachidonsäure ihre volle Aktivität entfaltet. In Wildtyp-Haut ist dagegen 2 h nach TPA-Behandlung ausschließlich COX-1 vorhanden, die bei deutlich höheren Arachidonsäurekonzentrationen aktiv wird (Smith et al., 2000). Diese Ergebnisse bestätigen

die bekannte proinflammatorische Funktion von COX-2 in der Initiationsphase akuter Entzündungen (Seibert et al., 1994; Mitchell et al., 1995). 6 h nach TPA-Applikation war das Ohrödem in transgenen Tieren gegenüber Wildtyp-Tieren signifikant vermindert. Eine ähnliche Beobachtung wurde in der Auflösungsphase von durch Carrageenin ausgelöster Pleuritis bei Ratten beobachtet (Gilroy et al., 1999). In diesem Tiermodell wurden zwei COX-2-Expressionswellen beobachtet, die sich durch ein unterschiedliches Produktrepertoire auszeichneten. Während in der frühen, durch polymorphkernige Leukozyten dominierten Phase hauptsächlich proinflammatorisches PGE₂ gebildet wurde, entstand in der von Makrophagen dominierten Regressionsphase hauptsächlich 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂. Dieses Prostaglandin wirkt anti-inflammatorisch, und zwar über die Aktivierung der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR)- γ und die Hemmung von NF κ B (Jiang et al., 1998; Ricote et al., 1998). Vorläufige Messungen an TPA-behandelten Ohrstanzen von Wildtyp- und transgenen Mäusen deuten in der Tat auf eine verstärkte 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂-Synthese in transgenen Ohren hin. Dieses könnte die insgesamt schwächere Ödembildung bei TPA-behandelten transgenen Tieren erklären. Zusammenfassend scheint die Funktion von COX-Isoenzymen während einer entzündlichen Reaktion abhängig vom proinflammatorischen Stimulus, den beteiligten Zelltypen sowie der Entzündungsphase zu sein.

6.3 COX-2-Expression und Talgdrüsenhyperplasie

Ein hervorstechendes Merkmal adulter K5-COX-2-transgener Mäuse war eine Talgdrüsenhyperplasie in verschiedenen Körperregionen. Diese ging mit einer erhöhten Sebumproduktion einher und die daraus resultierende Akkumulation von Sebum an der Hautoberfläche bedingte das fettige Aussehen der transgenen Tiere. Am stärksten ausgeprägt war die Anreicherung von epikutanem Sebum im Nacken- und Rückenbereich. Die stark transgenen Talgdrüsen waren durch eine erhöhte Anzahl von Alveolen charakterisiert, die sich aus gut differenzierten Sebozyten zusammensetzten und sich um einen erweiterten Talgdrüsenausführgang gruppierten. Jeder Talgdrüsenalveolus ist peripher von abgeflachten, lipidfreien Basalzellen umgeben, die das Talgdrüsenepithel bilden und die Keratine 14 und 5 exprimieren.

Die Talgdrüsenhyperplasie, charakterisiert durch eine für Hyperplasien typische Erhöhung des Ki67-Proliferationsindex (Wheatly et al., 1986), korrelierte mit einer konstitutiven COX-2-Expression in den basalen epithelialen Zellen des Talgdrüsengewebes.

Vor kurzem wurde gezeigt, daß PPAR eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Sebozyten spielen (Rosenfield et al., 1999). PPAR gehören zur gleichen Familie von

Transkriptionsfaktoren wie die nukleären Steroid-Hormon-Rezeptoren. Sie werden durch Ligandenbindung aktiviert und bilden Heterodimere mit Retinoid X-Rezeptoren (RXR) (Kerstein et al., 2000). In Säugern wurden mehrere PPAR-Subtypen (α , δ und γ) identifiziert, die unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen und durch unterschiedliche Liganden aktiviert werden (Mangelsdorf et al., 1995; Yu et al., 1995). In primären Sebozyten wird PPAR- γ exprimiert. Synthetische Aktivatoren dieser Isoform induzieren die terminale Differenzierung dieser Zellen (Rosenfield et al., 1999). Das bereits erwähnte 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ ist ein endogener Ligand von PPAR- γ (Forman et al., 1995) und promoviert die Adipogenese in kultivierten Fibroblasten (Kliwer et al., 1995). In immortalisierten epithelialen Zellen sowie in kolorektalen Krebszellen induziert 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂ darüber hinaus, über PPAR- γ , die Transkription von COX-2 (Meade et al., 1999; Chinery et al., 1999). In Makrophagenzelllinien und humanen Epithelzellen wird die COX-2-Expression hingegen durch PPAR- γ unterdrückt (Inoue et al., 2000; Subbaramaiah et al., 2001). Wie COX-2-Expression, COX-2-katalysierte Prostanoid-Synthese und PPAR-Aktivierung bei der Proliferation und Differenzierung von Sebozyten ineinander greifen, ist noch ungeklärt.

6.4 Effekte der K5 gesteuerten COX-2-Expression auf Haarfollikelmorphogenese und Haarwachstum

Die Haut von COX-2-Knock-out-Mäusen wies keine pathologischen Veränderungen auf (Langenbach et al., 1999). Mäuse, die COX-2 unter Keratin 5-Promotorkontrolle konstitutiv exprimierten, entwickelten dagegen einen ausgeprägten Haut- und Haarphänotyp. Die Körperbehaarung der transgenen Tiere bildete sich verzögert aus und ihr Fell blieb lebenslang weniger dicht als das ihrer nicht-transgenen Geschwister.

Die Plakodenbildung als erste Stufe der Haarfollikelmorphogenese wird durch mesenchymale-epitheliale Wechselwirkungen embryonal initiiert. Dabei wird sowohl die Gesamtzahl der Haarfollikel als auch deren Verteilungsmuster endgültig festgelegt. In embryonaler Wildtyp-Maushaut war COX-2 als mRNA und Protein ab dem 16. embryonalen Tag nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Für die embryonale Haut der Transgenen war davon auszugehen, daß der Keratin 5-Promotor die COX-2-Expression bereits ab Tag 14,5 flächendeckend anschaltete (Byrne et al., 1994). Diese verfrühte COX-2-Expression könnte sich auf die komplexen Interaktionen zwischen Dermis und den sich entwickelnden Haarfollikel ausgewirkt haben. In der Tat waren bei K5-COX-2-Transgenen die embryonalen Haarfollikelanlagen in der Rückenhaut leicht vermindert. Eine genaue Analyse der Haarfollikelmorphogenese bei COX-2-Transgenen steht noch aus.

Nach den bisherigen Beobachtungen schienen die durch das COX-2-Transgen ausgelösten Veränderungen eher für postnatale Morphogenesestadien relevant zu sein, da unmittelbar nach Geburt systemisch verabreichte selektive COX-2-Inhibitoren bei transgenen Mäusen zur Entwicklung eines dichten Wildtyp-Fells führten.

Am Tag 9 nach Geburt waren auf der Körperoberfläche von transgenen Mäusen kaum Haare sichtbar, während die Wildtyp-Geschwister schon ein dichtes Fell aufwiesen. Auch am 17. Tag waren die Haarschäfte in der transgenen Rückenhaut noch komplett vom Haarfollikel umschlossen und hatten die Hautoberfläche nicht durchbrochen. Das Transgen verzögerte also die späteren Schritte der Haarfollikelreifung, wie Produktion des Haarschafts und Ausbildung des Haarkanals. Für die Haarschaftbildung und -reifung sind mesenchymal-epitheliale Wechselwirkungen, die von der dermalen Papille gesteuert werden, und von den Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide ausgehende Signale von Bedeutung. In diesen Keratinozyten wird bei transgenen Tieren die zyklische, anagenspezifische COX-2 Expression von der konstitutiven transgenen COX-2-Expression überlagert. Möglicherweise kommt es so zu einer Interferenz mit den von der äußeren Wurzelscheide ausgehenden Signalen. Zu diesen Signalmolekülen gehören Cytokine wie TNF- α , INF- α und IL-1 (Ahmed et al., 1996; Carroll et al., 1997; Cheng et al., 1992), Wachstumsfaktoren, wie FGF-5 (Herbert et al. 1994; Du Cros, 1993; Katsuoka et al., 1987) und Morphogene, wie Wnt, β -Catenin sowie Sonic hedgehog, welches bei Drosophila die Segmentierung und Polarisation des Organismus steuert (Chuong et al., 1998; St. Jaques et al., 1998; Zhou et al., 1995; Millar et al., 1997). Sonic hedgehog wird während der Haarfollikelmorphogenese in einem polarisierten Muster exprimiert und spielt eine Rolle bei der Organisation und Ausrichtung der Haarfollikel. Der ungewöhnliche 90°-Winkel, mit dem in Transgenen die Haarfollikel zur Hautoberfläche angeordnet sind, könnte Folge eines gestörten Sonic hedgehog-Signals sein.

Die verzögerte Haarfollikelmorphogenese korrelierte mit einer verzögerten Ausdünnung der interfollikulären Rückenepidermis. Dabei geht die mehrschichtige neonatale Rückenepidermis, die der menschlichen Epidermis ähnelt, in ein dünnes orthokeratinisierendes Epithel über, das aus einer Schicht basaler und maximal zwei Lagen lose angeordneter suprabasaler Keratinozyten besteht. (Setälä et al., 1960). Dieser Ausdünnungsprozess, von dem vor allem Str. spinosum und granulosum betroffen sind (Weiss und Zelikson, 1975), war bei Wildtyp-Tieren 9-12 Tage, bei transgenen Mäusen hingegen erst zwischen dem 17. und 21. Tag nach der Geburt abgeschlossen. In Wildtyp-Haut ist nach dem 8. Tag COX-2-Protein nicht mehr nachweisbar (Leder, 1998). Die permanente COX-2-Expression in basalen Keratinozyten transgener Mäuse korrelierte also mit einer verzögerten Reifung der interfollikulären Epidermis. Allerdings lief die Expression der differenzierungsspezifischen Strukturproteine Keratin 5, Keratin 10, Involucrin und Loricrin ähnlich koordiniert wie beim Wildtyp ab.

Eine histologische Analyse ergab für transgene Mäuse keine signifikanten Änderungen im zeitlichen Ablauf des ersten Haarzyklus. Allerdings wurde mit zunehmendem Alter eine stetige Verkahlung festgestellt: 6 Monate alte transgene Mäuse besaßen durchschnittlich nur noch halb so viele Haarfollikel wie Wildtyp-Mäuse. Davon betroffen waren sowohl männliche als auch weibliche Tiere, obgleich bei Männchen die altersbedingte Alopezie stärker ausgeprägt schien. Ein synergistischer Effekt von androgenen Hormonen kann daher nicht ausgeschlossen werden (Kaufman, 1996). Anzeichen für eine Degeneration von Haarfollikeln aufgrund inflammatorischer Reaktionen (Makrophageninfiltration) oder Zystenbildung (Paus et al., 1999b) gab es nicht. Der Zusammenhang zwischen konstitutiver COX-2-Expression und verminderter Haarfollikeldichte in adulter Rückenhaut ist noch unklar, insbesondere da in transgener Schwanzhaut die Haarfollikeldichte normal war.

Hier wurde jedoch eine weitere Anomalie beobachtet: Ab einem Alter von 3 Monaten entwickelten sich Haarfollikel mit lateralen Sprossungen im proximalen, sich regenerierenden Teil. Diese epithelialen Invaginationen gingen aus der äußeren Wurzelscheide hervor und glichen embryonalen Haarkeimen und Haarzapfen. Die Proliferationsaktivität der vorwiegend basaloiden Keratinozyten dieser Sprosse wurde durch Ki-67 Immunhistochemie bestätigt.

Die zusätzlich angelegten Haarkeime entwickelten sowohl dermale Papillen als auch alle übrigen differenzierten Strukturen der Haarzwiebel und des zyklisierenden Follikelabschnittes, wie äußere und innere Wurzelscheide sowie rudimentäre Haarfasern. Eine Neubildung distaler Haarfollikelelemente, wie Haarkanal oder Talgdrüsen, wurde jedoch nicht beobachtet. Statt dessen waren Haarfollikel sichtbar, die aus zwei oder mehreren proximalen Haarfollikelanteilen mit gemeinsamen Isthmus und Infundibulum aufgebaut waren. Diese morphologischen Veränderungen scheinen die Folge einer gestörten Haarfollikelbildung zu sein. Die konstitutive COX-2-Expression in der äußeren Wurzelscheide scheint die bipotenten Stammzellen in der Wulstregion zur Bildung neuer Haarfollikel-ähnlicher Sprossungen anzuregen. Im Bereich der interfollikulären Epidermis trat keine zusätzliche Haarfollikelbildung auf.

Eine Neogenese von Haarfollikeln in interfollikulärer, hyperplastischer Mausepidermis wurde nach Langzeit-Behandlung mit dem COX-2-induzierenden Tumorpromotor-TPA beobachtet (Schweizer, 1979). Dies könnte auf einen Zusammenhang zwischen COX-2-Expression und Haarwachstum deuten.

Eine sowohl von der interfollikulären Epidermis als auch von der äußeren Wurzelscheide ausgehende De novo-Haarfollikelmorphogenese wird für transgene Mäuse beschrieben, die eine N-terminal stabilisierte Form von β -Catenin ($\Delta N87\beta$ Cat) unter der Kontrolle eines Keratin 14-Promotors im basalen Epidermiskompartiment exprimierten (Gat et al., 1998). Die postembryonale Haarfollikelmorphogenese setzte bei diesen Tieren mit Beginn des ersten postnatalen Haarzyklus ein und brachte voll ausgebildete eigenständige Haarfollikel hervor. Die epithelialen Invaginationen der äußeren Wurzelscheide entwickelten sich da-

bei, im Gegensatz zu den K5-COX-2-Mäusen, aus dem permanenten Abschnitt des Haarfollikels. Darüber hinaus war bei diesen Mäusen die De novo-Follikelmorphogenese auf die Rückenhaut beschränkt und aber in Schwanz- und Bauchhaut zu beobachten. Dies bestätigt den Eindruck, daß die mesenchymal-epidermalen Wechselwirkungen, die sowohl die Embryonalentwicklung als auch lebenslang den Haarzyklus steuern, für jede Körperregion und jeden Haartyp spezifisch reguliert werden.

Ein konditioneller Knock-out von β -Catenin im basalen Epidermiskompartiment nach abgeschlossener Haarfollikelmorphogenese bedingt einem kompletten Verlust aller Haarfollikel nach dem ersten Haarzyklus und verhindert die Entwicklung von Stammzellen zu follikulären Keratinozyten (Huelsken et al., 2001). Eine Untersuchung der β -Catenin-Expression in COX-2-transgener Epidermis wäre daher von Interesse.

6.5 Der Störung der terminalen Differenzierung in K5-COX-2-transgener Schwanzhaut

Die Effekte der konstitutiven Überexpression von COX-2 auf die epidermale Differenzierung waren bei adulten Mäusen am deutlichsten in der Schwanzhaut ausgeprägt. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, könnten aber in lokalen Schwankungen der COX-2-Expressionsintensität, den produzierten Prostaglandin-Typen und -Konzentrationen sowie den unterschiedlichen Ausstattungen der jeweiligen Zelltypen mit Prostaglandinrezeptoren liegen. Darüber hinaus unterscheiden sich Schwanz-, Bauch- und Rückenepidermis bezüglich des Differenzierungsmusters und der Stratifizierung. So ist die Epidermis der stark behaarten Rumpfhaut ein dünnes orthokeratinisierendes Epithel, während sich die wenig behaarte, vielschichtige Schwanzepidermis in Abschnitte aus orthokeratotischen Inter-Schuppen- und parakeratotischen Schuppenregionen gliedert (Schweizer und Marks, 1977). Die bei COX-2-transgenen Mäusen beobachteten Gewebsveränderungen konzentrierten sich auf die parakeratotischen Schuppen. Die regelmäßige Anordnung von ortho- und parakeratotischen Bereichen war dagegen nicht beeinflusst.

Die konstitutive Expression von COX-2 in den basalen Keratinozyten korrelierte in den parakeratotischen Regionen mit einer ausgeprägten epidermalen Hyperplasie, die sowohl durch eine Vermehrung der lebenden Zellschichten als auch durch eine starke Hyperkeratose des Str. corneums gekennzeichnet war. Makroskopisch war die Verdickung der Hornschicht als eine stark schuppige Schwanzhaut sichtbar. Die Hyperplasie der lebenden Keratinozytenschichten ging einher mit einem endophytisch-papillären Wachstum.

Epidermale Hyperplasien sind in der Regel durch eine Ausweitung der Proliferationszone auf das suprabasale Kompartiment gekennzeichnet. Dies galt auch für COX-2-transgene

Schwanzepidermis. Jedoch war der Proliferationsindex im Vergleich zu Wildtyp-Epidermis nicht signifikant erhöht. Damit unterschied sich die Hyperplasie der interfollikulären Epidermis sowohl von der Talgdrüsenhyperplasie (s. 6.3), als auch von der hyperplastischen Epidermis von Mäusen mit hairless-Mutation (Berton et al., 1997). Auch benigne hyperproliferative Erkrankungen des Menschen wie Psoriasis, Verrucia vulgaris und Keratoakanthome, prä maligne Läsionen wie aktinischen Keratosen sowie Plattenepithel- und Basalzellkarzinome zeichnen sich durch einen erhöhten Proliferationsindex aus (Baum et al., 1993; Lu et al., 1999; Kawahira, 1999).

Eine immunhistochemische Analyse der Keratin 5- und Keratin 10-Expression zeigte, daß es sich bei den vermehrten Lagen lebender Keratinozyten in transgener Epidermis sowohl um eine Expansion des basalen, als auch des suprabasalen Zellpools handelte. 2 bis 8 Lagen Keratin 5-positive Keratinozyten wurden in transgener Epidermis gefunden. Sogar Keratinozyten mit der typischen abgeflachten Form suprabasaler Zellen exprimierten noch das basale Keratin 5. Dieser Zustand ähnelt bestimmten Stadien der Embryonalentwicklung, wo proliferationsaktive, suprabasale Zellen Keratin 5 unabhängig von der Stratifizierung des Gewebes exprimieren. Allerdings sehen diese Zellen basaloid aus (Byrne et al., 1994). Aber auch bei epidermalen Dysplasien wird eine diffuse Keratin 5-Expression in der gesamten Epidermis sichtbar, die mit einer verminderten Keratin 10-Expression gekoppelt ist. Fehlendes Keratin 10 bedingt eine Demaskierung der Keratin 5-Epitope, wodurch dieses immunhistochemisch nachweisbar wird (Arbeit, 1996). Dies zeigte sich auch in transgener Schwanzepidermis. In manchen Bereichen grenzte das einlagig ausgebildete Str. basale an eine Vielzahl Keratin 10 exprimierender Keratinozytenschichten, während in einigen papillären Lappungen und im Bereich von Basalzellhyperplasien die Expression dieses frühen Differenzierungsmarkers (Fuchs, 1995) lokal reduziert war oder sogar völlig fehlte. Die Expression des im oberen Str. spinosum gebildeten Involucrins (Eckert et al., 1993) war in transgener Schwanzepidermis deutlich vermindert und auf wenige individuelle Keratinozyten beschränkt. Des weiteren war das Signal des späten Differenzierungsproteins exprimierten Loricrin (Mehrel et al., 1990) in transgener Epidermis vergleichsweise schwach.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die konstitutive Expression von COX-2 das Fließgleichgewicht zwischen terminaler Differenzierung und Proliferation von Keratinozyten verschoben hatte, indem es deren Eintritt in die postmitotische Phase verzögerte. Deshalb scheint auch die beobachtete Hyperkeratose eher die Folge einer verlangsamten Desquamation der Korneozyten an der Hautoberfläche als einer gesteigerten Keratinisierung zu sein.

Ein wichtige Rolle bei epithelialen Differenzierungsprozessen spielen die durch Adhäsionsmoleküle vermittelten interzellulären und Zell-Matrix-Wechselwirkungen. In Kolonzelllinien bewirkt eine konstitutive COX-2-Expression eine verstärkte Adhäsion an die extrazelluläre Matrix. (Tsujii und DuBois, 1995). Ob Ähnliches für K5-COX-2 transgene Schwanzepidermis gilt, muß noch untersucht werden. Ein Indiz für veränderte Zell-Zell-

und Zell-Matrix-Interaktionen könnte der fokal auftretende Verlust der Zellpolarität von basalen Keratinozyten in hyperplastischen Papillen sein. Dies ist neben der aberranten Expression der Differenzierungsmarkerproteine ein weiteres Kriterium für dysplastische Läsionen. Bereits bei 7 Wochen alten transgenen Mäusen wurden solche dysplastischen Herde in Schwanzhaut nachgewiesen. In Papillomen, die durch das Initiations-Promotions-Protokoll erzeugt wurden, sind solche Dysplasien charakteristische Anzeichen für eine neoplastische Transformation (Aldaz et al., 1987).

Außerdem bildeten sich in transgener Schwanzhaut epitheliale Invaginationen, die aus bis zu 30 Lagen gut differenzierter Keratinozyten und zentralen Hornperlen aus konzentrischen Ringen von Keratinlamellen bestanden und somit eher seborrhoischen Keratosen des Menschen glichen (Noltenius et al., 1987). Sichtbare Anzeichen für eine Desintegration der Basalmembran gab es nicht und auch leukozytäre Infiltrate waren in transgener Haut nicht zu beobachten.

Der kausale Zusammenhang zwischen der in transgener Schwanzepidermis auftretenden Hyperplasie und COX-2-vermittelter Prostaglandin-Synthese wurde durch die Versuche mit hochselektiven COX-2-Inhibitoren klar: Die Hemmung der Prostaglandin-Synthese korrelierte dosisabhängig mit einer Milderung der terminalen Differenzierungsstörung und der hyperplastisch-dysplastischen Gewebsveränderung. Welches Prostaglandin an der hyperplastischen Transformation des Epithels beteiligt war, muß noch geklärt werden.

6.6 COX-2-Expression und Vaskularisierung

In transgener Schwanzhaut wurde eine verstärkte Vaskularisierung der Dermis festgestellt. Darüber, ob es sich dabei um eine Neogenese oder eine Umstrukturierung bereits existierender Blutgefäße handelt, kann zur Zeit keine Aussage gemacht werden. Die gesteigerte subepidermale Blutgefäßdichte fördert wahrscheinlich durch eine verbesserte Gewebsversorgung, ähnlich wie beim Tumorwachstum (Folkman, 1995; Hanahan et al., 1996), die Expansion der papillären epithelialen Läsionen.

Im Bereich der COX-2-positiven hyperplastischen Epidermispapillen war die Gefäßdichte in der Tat besonders erhöht. Dies deutet darauf hin, daß die konstitutive COX-2-Expression im Basalzellkompartiment der Epidermis und die damit korrelierenden erhöhten Prostaglandinspiegel die Ausbreitung der dermalen Gefäße stimulierte. Nach neueren Beobachtungen spielen COX-2 und die über COX-2 gebildete Prostanoid eine Schlüsselrolle bei der Tumor-Angiogenese (Tsuji et al., 1998; Prescott et al., 2000). PGE₂ und PGI₂ stimulieren parakrin die endotheliale Zellmigration und Endothelzelldifferenzierung (Jones et al., 1999; Tsuji et al., 1998) sowie die Produktion proangiogener Faktoren (Sawaoka et

al., 1999; Jones et al., 1999; Daniel et al., 1999; Williams et al., 2000; Masferrer et al., 2000). Besonders die parallelen Expressionsmuster von COX-2 und VEGF sowie die drastisch reduzierten VEGF-Spiegel bei COX-2^{-/-}-Fibroblasten sprechen für einen kausalen Zusammenhang zwischen COX-2-Expression und Angiogenese (Williams et al., 2000). Ob die COX-2-Überexpression auch in Keratinozyten eine verstärkte VEGF-Produktion nach sich zieht und so die in transgener Haut erhöhte Gefäßdichte bedingt, ist Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

Während der anagenen Phase des Haarzyklus geht die Verdichtung des perifollikulären Plexus mit einer gesteigerten VEGF-Produktion in den basalen Keratinozyten der äußeren Wurzelscheide einher (Yano et al., 2001). Zeitgleich erreicht die follikuläre COX-2-Expression im anagenen Haarfollikel ein Maximum. Damit übereinstimmend war in K5-COX-2-transgener Haut das perifollikuläre Gefäßsystem ebenfalls stark ausgeprägt. Welche Faktoren und welcher Zelltyp aber letztlich ausschlaggebend für die COX-2-induzierte Angiogenese sind, muß sowohl für die Tumoriangiogenese (Yancopoulos et al., 2000) als auch für die Gefäßbildung in K5-COX-2 transgener Haut noch untersucht werden.

6.7 COX-2 und epidermale Tumorentwicklung in der Maushaut

Die transgene konstitutive COX-2 Expression in basalen Keratinozyten der interfollikulären Epidermis und Zellen der äußeren Wurzelscheide überlagerte die vorübergehende COX-2 Expression, die bei Gewebsschädigung und Reizung induziert wird. Der mit der transgenen COX-2-Expression verknüpfte epidermale Phänotyp, charakterisiert durch Hemmung der terminalen Differenzierung, hyperplastische und dysplastische Veränderungen der Epidermis und erhöhte dermale Blutgefäßdichte entspricht Veränderungen bei der epidermalen Karzinogenese, insbesondere beim Prozess der Tumorpromotion. Eine Hemmung der terminalen Differenzierung würde die klonale Expansion von durch Karzinogeneinwirkung initiierten Keratinozyten und eine Erhöhung der dermalen Gefäßdichte die Versorgung der sich entwickelnden Tumore fördern. In Papillomen mit konstitutiver COX-2-Expression ist dieser Phänotyp fokal realisiert. Bedeutet dies, daß Tumore sich in der Haut der transgenen Mäuse durch Auto-Promotion bilden können ?

In einer Serie von noch nicht abgeschlossenen Experimenten nach dem Initiations-Promotions-Protokoll konnte diese Frage, teilweise beantwortet werden. In der Tat scheint die Initiation mit DMBA in der Haut transgener Mäuse ein hinreichendes Signal für die Entstehung von Papillomen zu sein, während bei Wildtyp-Mäusen eine zusätzliche Tumorpromotion mit dem Phorbol-ester TPA erforderlich war. Dieses Ergebnis bestätigt pharmakologische und genetische Befunde, wonach ein kausaler Zusammenhang zwischen

Tumorentwicklung und COX-2-Expression im Kolon (Oshima et al., 1996), aber auch in der Haut von Mäusen besteht (Müller-Decker et al., 1998b; Seibert et al., 1999; Langenbach et al., 1999). In meiner Arbeit konnte ich zum ersten Mal die auto-promovierende Wirkung von COX-2 in Karzinogen-initiiertter Mausepidermis zeigen.

Die transgen exprimierte COX-2 verstärkte die tumorpromovierende Wirkung von TPA dagegen nicht, d.h. im Gegenteil: im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen begann die Tumorentwicklung in TPA-behandelter transgener Haut sogar mit einer deutlichen Verzögerung, was auf eine inhibitorische Wirkung der konstitutiven COX-2 deuten könnte. Ob hier die vorher diskutierten entzündungshemmenden Eigenschaften von COX-2, wie sie beim TPA-induzierten Ödem in transgener Ohrhaut beobachtet wurden (vgl. 6.2), eine Rolle spielen, bleibt zu klären. Ohnehin sind entzündliche Prozesse vor allem in der Anfangsphase der Tumorpromotion mit TPA zu beobachten und nehmen mit zunehmender Behandlungsdauer, vermutlich aufgrund adaptiver Prozesse, ab.

7 Literaturverzeichnis

- Agarwal, R. and Mukthar, H. (1991) Cutaneous chemical carcinogenesis. In: Pharmacology of the skin. Ed.: Mukthar, H., CRC Press, Boca Raton, FL, pp 317-387
- Ahmed, A.A., Nordlind, K., Schultzberg, M., Brakenhoff, J., Bristulf, J., Novick, D., Svenson, S.B., Azizi, M., and Liden, S. (1996) Immunochemical studies of proinflammatory cytokines and their receptors in hair follicles of normal human skin. *Acta Derm. Venerol.*, **76**: 248-352
- Aldaz, C.M., Conti, C.J., Klein-Szanto, A.J.P., and Slaga, T.J. (1987) Progressive dysplasia and aneuploidy are hallmarks of mouse skin papillomas: Relevance to malignancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 2029-2032
- Arbeit, J.M. (1996) Transgenic models of epidermal neoplasia and multistage carcinogenesis. *Cancer Surv.*, **26**: 7-24
- Bakhle, Y.S. and Botting, R.M. (1996) Cyclooxygenase-2 and its regulation in inflammation. *Mediat. Inflamm.*, **5**: 305-323
- Balmain, A., Brown, K., Akhurst, R.J., and Fee, F.M. (1988) Molecular analysis of chemical carcinogenesis in the skin. *Br. J. Cancer. Suppl.*, **9**: 72-75
- Balmain, A. and Harris, C.C. (2000) Carcinogenesis in mouse and human cells: Parallels and paradoxes. *Carcinogenesis*, **21**: 371-377
- Balsinde, J., Balboa, M.A., Insel, P.A., and Dennis, E.A. (1999) Regulation and inhibition of phospholipase A₂. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **39**: 175-189
- Baum, H.P., Meurer, I., and Unteregger, G. (1993) Ki-67 antigen expression and growth pattern of basal cell carcinomas. *Arch. Dermatol. Res.*, **285**: 291-295
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of β -catenin with the transcription factor Lef-1. *Nature*, **382**: 638-642
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D., and Birchmeier, W. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3 β . *Science*, **280**: 596-599
- Berton, T.R., Mitchell, D.L., Fischer, S.M., and Locniskar, M.F. (1997) Epidermal proliferation but not quantity of DNA-photodamage is correlated with UV-induced mouse skin carcinogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, **109**: 340-347
- Blessing, M., Zentgraf, H., and Jorcano, J.L. (1987) Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5' upstream sequences. *EMBO J.*, **6**: 567-575
- Blessing, M., Nanney, L.B., King, L.E., Jones, C.M., and Hogan, B.L. (1993) Transgenic mice as a model to study the role of TGF- β -related molecules in hair follicles. *Genes & Dev.*, **7**: 204-215
- Borradori, L. and Sonnenberg, A. (1996) Hemidesmosomes: Roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **8**: 647-656
- Breder, C.D., DeWitt, D.L., and Kriag, R.P. (1995) Characterization of inducible cyclooxygenase in brain. *J. Comp. Neurol.*, **355**: 296-415
- Breder, C.D. and Saper, C.B. (1996) Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res.*, **713**: 64-69

- Brown, K., Burns, P.A., and Balmain, A. (1995) Transgenic approaches to understanding the mechanisms of chemical carcinogenesis in mouse skin. *Toxicol. Lett.*, **82-83**: 123-130
- Buckman, S.Y., Gresham, A., Hale, P., Hruza, P., Anast, J., Masferrer, J., and Pentland, A.P. (1998) Cox-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: Implication for the development of skin cancer. *Carcinogenesis*, **19**: 723-729
- Burns, P.A., Kemp, C.J., Gannon, J.V., Lane, D.P., Bremmer, R., and Balmain, A. (1991) Loss of heterozygosity and mutational alteration of the p53 gene in skin tumors of interspecific hybrid mice. *Oncogene*, **6**: 2363-2369
- Byrne, C., Tainsky, M., and Fuchs, E. (1994) Programming gene expression in developing epidermis. *Development*, **120**: 2369-2383
- Carroll, J.M., Crompton, T., Seery, J.P., and Watt, F.M. (1997) Transgenic mice expressing INF- γ in the epidermis have eczema, hair hypopigmentation and hair loss. *J. Invest. Dermatol.*, **108**: 412-422
- Casatorres, J., Navarro, J.M., Blessing, M., and Jorcano, J.L. (1994) Analysis of the control of the expression and tissue specificity of the keratin 5 gene, characteristic of basal keratinocytes: Fundamental role of an AP-1 element. *J. Biol. Chem.*, **269**: 20489-10496
- Chan, E.F., Gat, U., McNiff, J.M., and Fuchs, E. (1999) A common human skin tumour is caused by activating mutations in β -catenin. *Nat. Genet.*, **21**: 410-413
- Chase, H.B., Rauch, H., and Smith, V.W. (1951) Critical stages of hair development and pigmentation in mouse. *Physiol. Zool.*, **24**: 1-8
- Chase, H.B. (1954) Growth of the hair. *Physiol. Rev.*, **34**: 113-126
- Cheng, J., Turksen, K., Yu, Q.C., Schreiber, H., Teng, M., and Fuchs, E. (1992) Cachexia and graft-vs-host disease-type skin changes in keratin promotor driven TNF α transgenic mice. *Genes Dev.*, **6**: 1444-1256
- Chinery, R., Coffey, R.J., Graves-Deal, R., Kirkland, S.C., Sanchez, S.C., Zackert, W.E., Oates, J.A., and, Morrow, J.D. (1999) Prostaglandin J₂ and 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ induce proliferation of cyclooxygenase-depleted colorectal cancer cells. *Cancer Res.*, **59**: 2739-2746
- Clark, S.K. and Phillips, R.K.S. (1996) Desmoids in familial adenomatous poliposis. *Br. J. Surg.*, **83**: 1494-1504
- Cotsarelis, G., Cheng, S.Z., Dong, G., Sun, T.-T., and Lavker, R.M. (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: Implications on epithelial stem cells. *Cell*, **57**: 201-209
- Crofford, L.J., Wilder, R.L., Ristimäki, A.P., Sano, H., Remmers, E.F., Epps, H.R., and Hla, T. (1994) Cyclooxygenase-1 and -2 expression in rheumatoid synovial tissues. Effects of interleukin-1 beta, phorbol ester, and corticosteroids. *J. Clin. Invest.*, **93**: 1095-1101.
- Crofford, L.J. (1997) COX-1 and COX-2 tissue expression: Implications and predictions. *J. Rheum.*, **24**: 15-19
- Dale, B.A., Holbrook, K.A., Kimball, J.R., Hoff, M., and Sun, T.-T. (1985) Expression of epidermal keratins and fillagrin during human fetal skin development. *J. Cell Biol.*, **101**: 1257-69
- Daniel, T.O., Liu, H., Morrow, J.D., Crews, B.C., and Marnett, L.J. (1999) Thromboxane A₂ is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.*, **59**: 4574-4577

- Dennis, E.A. (1997) The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *TiBS*, **22**: 1-2
- DeWitt, D.L. and Smith, W.L. (1988) Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**: 1412-1416
- Dinchuk, J.E., Car, B.D., Focht, R.L., Johnston, J.J., Jaffee, B.D., Covington, M.B., Con-
tel, N.R., Eng, V.M., Collins, R.J., Czerniak, P.M., Gorry, S.A., and Trzaskos, J.M.
(1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking
cyclooxygenase II. *Nature*, **23**: 406-409
- Dry, F.W. (1926) The coat of the mouse (*mus musculus*). *J. Genet.*, **16**: 287-340
- DuBois, R.N., Radhika, A., Reddy, B.S., and Enting, A.J. (1996) Increased cyclooxyge-
nase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology*, **110**: 1259-
1262
- DuBois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van de Putte,
L.B.A., and Lipsky, P.E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.*,
12: 1063-1073
- Du Cros, D.L (1993) Fibroblast growth factor influences the development and cycling of
murine hair follicles. *Dev. Biol.*, **98**: 109-115
- Eady, R.A.J. (1988) The basement membrane. *Arch. Dermatol.*, **77**: 18-27
- Eberhart, C.E., Coffey, R.J., Radhika, A., Giardiello, F.M., Ferrenbach, S., and DuBois,
R.N. (1994) Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorec-
tal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology*, **107**: 1183-1188
- Eckert, R.L., Yaffe, M.B., Crish, J.F., Murthy, S., Rorke, E.A., and Welter, J.F. (1993)
Involucrin-structure and role in envelope assembly. *J. Invest. Dermatol.*, **100**: 613-
617
- Eckert, R.L. and Welter, J.F. (1996) Epidermal keratinocytes-genes and their regulation.
Cell Death Diff., **3**: 373-383
- Eckert, R.L., Crish, J.F., Banks, E.B., and Welter, J.F. (1997) The epidermis: Genes on -
genes off. *J. Invest. Dermatol.*, **109**: 501-509
- Elias, P.M. (1983) Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J. Invest. Derma-
tol.*, **80**: 40-49
- Elias, P.M., Cullandre, C., Mauro, T., Rassner, U., Kömüves, L., Brown, B.E., and Menon,
G.K. (1998) The secretory granular cell: The outermost granular cell as a speciali-
zed secretory cell. *J. Invest. Dermatol. Symposiums Proceedings*, **3**: 87-100
- Ensor, C.M. and Tai, H.H. (1995) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J. Lipid. Med.
Cell Signal.*, **12**: 313-319
- Feng, L., Sun, W., Xia, Y., Tang, W.W., Channugam, P., Soyoola, E., Wilson, C.B., and
Hwang, D. (1993) Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regula-
tion of their expression. *Archiv. Biochem. and Biophys.*, **307**: 361-368
- Fischer, S.M., Lo, H.H., and Maldve, R.E. (1997) Regulation of arachidonic acid release
and metabolism by tumor promoters. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **400A**: 433-438
- Fischer, S.M., Lo, H., Gordon, G.B., Seibert, K., Keloff, G., Lubet, R.A., and Conti, C.J.
(1999) Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibi-
tor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis. *Molec.
Carcinogenesis*, **25**: 231-240

- Fletcher, B.S., Kubuju, D.A., Perrin, D.M., and Herschman, H.R. (1992) Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**: 4334-4338
- Folkman, I. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, **1**: 27-31
- Forman, B.M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R.P., Spiegelman, B.M., and Evans, R.M. (1995) 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 is a ligand for adipocyte determination factor PPAR γ . *Cell*, **83**: 803-812
- Forman, B.M., Chen, J., and Evans, R.M. (1996) The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **804**: 266-275
- Forsberg, L., Leeb, L., Thoren, S., Morgenstern, R., and Jakobson, P. (1999) Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FEBS Lett.*, **471**: 78-82
- Frances, C. and Robert, L. (1984) Elastin and elastic fibers in normal and pathologic skin. *Int. J. Dermatol.*, **23**: 166-170
- Franke, W.W., Schiller, D.L., Moll, R., Winter, S., Schmid, E., Engelbrecht, I., Denk, H., Krepler, R., and Platzer, B. (1981) Diversity of cytokeratins specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues. *J. Mol. Biol.*, **153**: 933-959
- Frölich, J.C. (1997) A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *TiPS*, **18**: 30-34
- Fuchs, E. and Green, H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, **19**: 1033-1042
- Fuchs, E. (1990) Epidermal differentiation: The bare essentials. *J. Cell Biol.*, **111**: 2807-2814
- Fuchs, E. (1993) Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J. Cell Science*, **Suppl. 17**: 197-208
- Fuchs, E. (1995) Keratins and the skin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, **11**: 123-153
- Fuchs, E., Dowling, J., Segre, J., Lo, S.H., and Yu, Q-C. (1997) Integrators of epidermal growth and differentiation: Distinct functions for b1 and b4 integrins. *Curr. Opin. Gen. Develop.*, **7**: 672-682
- Fürstenberger, G. and Kopp-Schneider, A. (1995) Malignant progression of papillomas induced by the initiation-promotion protocol in NMRI mouse skin. *Carcinogenesis*, **16**: 61-69
- Fürstenberger, G. and Marks, F. (1980) Early prostaglandin E synthesis is an obligatory event in the induction of proliferation in mouse epidermis in vivo by the phorbol ester TPA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**: 749-756
- Fürstenberger, G. and Marks, F. (1987) Involvement of prostaglandins in the process of skin tumor promotion. In: Eicosanoids and Cancer, Raven Press, New York, pp 91-100
- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998) De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated β -catenin in skin. *Cell*, **95**: 605-614
- Giardiello, F.M., Hamilton, S.R., Krush, A.J., Piantadosi, S., Hyland, L.M., Celano, P., Booker, S.V., and Offerhaus, G.J. (1993) Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.*, **328**: 1313-1316
- Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., and Willoughby, D.A. (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat. Med.*, **5**: 698-701

- Gilroy, D.W. and Coville-Nash, P.R. (2000) New insights into the role of COX 2 in inflammation. *J. Mol. Med.*, **78**: 121-129
- Goetzl, E.J., An, S., and Smith, W.L. (1995) Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *FASEB J.*, **9**: 1051-1058
- Granström, E. and Kumlin, M. (1987) Metabolism of prostaglandins and lipoxygenase products: Relevance for eicosanoid assay. In: Prostaglandins and related substances. Eds.: Beedetto, C., McDonald-Gibson, R.G., Nigam, S., and Slater, T.F., IRL Press, Oxford, pp 5-27
- Gschwendt, M., Kittstein, W., Fürstenberger, G., and Marks, F. (1984) The mouse ear edema: a quantitatively evaluable assay for tumor promoting compounds and for inhibitors of tumor promotion. *Cancer Lett.*, **25**: 177-185
- Guan, Y., Chang, M., Cho, W., Zhang, Y., Redha, R., Davis, L., Chang, S., DuBois, R.N., Hao, C.M., and Breyer, M. (1997) Cloning, expression, and regulation of rabbit cyclooxygenase-2 in renal medullary interstitial cells. *Am. J. Physiol.*, **271**: F18-F26
- Hammarström, S., Lindgren, J.A., Marcelo, C., Duell, E.A., Anderson, T.F., and Vorhees, J.J. (1979) Arachidonic acid transformations in normal and psoriatic skin. *J. Invest. Dermatol.*, **73**: 180-183
- Hanahan, D., Christofori, G., Naik, P., and Arbeit, J. (1996) Transgenic mouse models of tumor angiogenesis: the angiogenic switch, its molecular controls, and prospects for preclinical therapeutic models. *Eur. J. Cancer*, **32**: 2386-2393
- Hanif, R., Pittas, A., Feng, Y., Koutsos, M.I., Qioa, L., Staiano-Coico, L., Shiff, S.I., and Rigas, B. (1996) Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by prostaglandin-independent pathway. *Biochem. Pharmacol.*, **52**: 237-245
- Hao, X., Bishop, A.E., Wallace, M., Wang, H., Willcocks, T.C., Maclouf, J., Polak, J.M., Knight, S., and Talbot, I.C. (1999) Early expression of cyclo-oxygenase-2 during sporadic colorectal carcinogenesis. *J. Pathol.*, **187**: 295-301
- Hardy, M.H. (1992) The secret life of hair follicles. *Trends Genet.*, **8**: 159-166
- Harris, R.C., McKanna, J.A., Akai, Y., Jacobson, H.R., DuBois, R.N., and Breyer, M.D. (1994) Cyclooxygenase is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J. Clin. Invest.*, **94**: 2504-2510
- Hashimoto, K. (1971a) Ultrastructure of the human toenail: II. Keratinization and formation of the marginal band. *J. Ultrastruct. Res.*, **36**: 391-398
- Hashimoto, K. (1971b) The marginal band: A demonstration of thickened cellular envelope of the human nail cell with the aid of lanthanum staining. *Arch. Dermatol.*, **128**: 387-394
- Herbert, J.M., Rosenquist, T., Gotz, J., and Martin, G.R. (1994) FGF5 as a regulator of hair growth cycle: evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell*, **78**: 1017-1025
- Herschman, H.R. (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. In: Annual Review of Biochemistry. Eds.: Richardson, C.C., Abelson, J.N., Meister, A., and Walsh, C.T.W., Paolo Alto, CA., vol 60, pp 281-319
- Hogan, B., Constantin, F., and Lacy, E. (1986) Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY.
- Hohl, D. (1990a) Cornified cell envelope. *Dermatologica*, **180**: 201-211

- Hohl, D. (1990b) Ein neuer Stern am Himmel der epidermalen Proteine: Loricrin - was ist das? *Hautarzt*, **41**: 299-301
- Hohl, D., Ruf Olano, B., de Viragh, P.A., Huber, M., Detrisac, C.J., Schnyder, U.W., and Roop, D.R. (1993) Expression pattern of loricrin in various species and tissues. *Differentiation*, **54**: 25-34
- Hohl, D., Ruf Olano, B., de Viragh, P.A., Huber, M., Detrisac, C.J., Schnyder, U.W., and Roop, D.R. (1993) Expression pattern of loricrin in various species and tissues. *Differentiation*, **54**: 25-34
- Hohl, D., Ruf Olano, B., de Viragh, P.A., Huber, M., Detrisac, C.J., Schnyder, U.W., and Roop, D.R. (1993) Expression pattern of loricrin in various species and tissues. *Differentiation*, **54**: 25-34
- Huelsken, J., Vogel, R., Erdman, B., Cotsarelis, G., and Birchmeier, W. (2001) β -Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*, **105**: 533-545
- Inoue, H. and Tanabe, T. (1998) Transcriptional role of nuclear factor kappa B site in the induction by lipopolysaccharide and suppression by dexamethasone of cyclooxygenase-2 in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**: 143-148
- Inoue, H., Tanabe, T., and Umesono, K. (2000) Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPAR γ . *J. Biol. Chem.*, **275**: 28028-28032
- Jackson, B.W., Grund, C., Winter, S., Franke, W.W., and Illmensee, K. (1981) Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation*, **20**: 203-216
- Jackobsson, P.-J., Thorén, S., Morgenstern, R., and Samuelson, B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 7220-7225
- Jiang, C., Ting, A.T., and Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, **391**: 82-86
- Jones, D.A., Carlton, D.P., McIntyre, T.M., Zimmermann, G.A., and Prescott, S.M. (1993) Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxidase type II and demonstration of expression response to cytokines. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9045-9049
- Jones, J.C.R., Hopkinson, S.B., and Goldfinger, L.E. (1998) Structure and assembly of hemidesmosomes. *BioEssays*, **20**: 488-494
- Jones, M.K., Wang, H., Peskar, B.M., Levin, E., Itani, R.M., Sarfeh, I.J., and Tarnawski, A.S. (1999) Inhibition of angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nature Med.*, **5**: 1418-1423
- Kargman, S., O'Neill, G., Vickers, P., Evans, J., Mancini, J., and Jothy, S. (1995) Expression of prostaglandin G/H synthase-1 and -2 protein in human colon cancer. *Cancer Res.*, **55**: 2556-2559
- Kast, R., Fürstenberger, G., and Marks, F. (1993) Phorbol ester TPA- and bradykinin-induced arachidonic acid release from keratinocytes is catalyzed by a cytosolic phospholipase A₂. *J. Invest. Dermatol.*, **101**: 567-572
- Katsuoka, K., Schell, H., and Wessel, B. (1987) Effects of epidermal growth factor, fibroblast growth factor, minoxidil, and hydrocortisone on growth kinetics in hu-

- man hair bulb cells and root sheath fibroblasts cultured in vivo. *Arch Dermatol. Res.*, **279**: 247-253
- Kaufman, K.D. (1996) Androgen metabolism as it affects hair growth in androgenetic alopecia. *Dermatol. Clin.*, **126**: 697-711
- Kawahira, K. (1999) Immunohistochemical staining of proliferating nuclear antigen (PCNA) in malignant and nonmalignant skin diseases. *Arch. Dermatol. Res.*, **191**: 413-418
- Kennedy, B.P., Chan, C., Culp, S.A., and Cromlish, W.A. (1993) Cloning and expression of rat prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase)-2 cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **197**: 494-500
- Kerstein, S., Desvergne, B., and Wahli, W. (2000) Roles of PPARs in health and disease. *Nature*, **405**: 421-424
- Kliwer, S.A., Lenhard, J.M., Willson, T.M., Patel, I., Morris, D.C., and Lehmann, J.M. (1995) A prostaglandin J₂ metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation. *Cell*, **83**: 813-819
- Kopan, R. and Fuchs, E. (1989) A new look into an old problem: Keratins as a tool to investigate determination, morphogenesis, and differentiation in skin. *Genes Dev.*, **3**: 1-15
- Kraemer, S.A., Meade, S.A., and DeWitt, D.L. (1992) Prostaglandin endoperoxidase synthase gene structure: Identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem. Biophys.*, **293**: 391-400
- Kubuju, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W., and Herschman, H.R. (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter inducible mRNA from Swiss 3T3 cells encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. Biol. Chem.*, **266**: 12866-12872
- Kune, G., Kune, S., and Watson, L. (1988) Colorectal cancer risk, chronic illness, operations, and medication: case control results from the Melbourne Cancer Study. *Cancer Res.*, **48**: 4399-4404
- Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegemann, R.A. et al. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, **384**: 644-648
- Kutcher, W., Jones, D.A., Matsunami, N., Groden, J., McIntyre, T.M., Zimmermann, G.A., White, R.L., and Prescott, S.M. (1996) Prostaglandin H synthase-2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 4816-4820
- Kyshe-Anderson, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**: 203-209
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685
- Lambeau, G. and Lazdunski, M. (1999) Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**: 162-170
- Langenbach, R., Morham, S.G., Tiano, H.F., Loftin, C.D., Ghanayem, B.I., Chulada, P.C., Mahler, J.F., Goulding, E.H., Kluckman, K.D., Kim, H.S., and Smithies, O. (1995) Prostaglandin gene disruption in mice reduces arachidonic acid induced inflammation and indomethacin induced gastric ulceration. *Cell*, **83**: 483-493

- Langenbach, R., Loftin, C., Lee, C., and Timo, H. (1999) Cyclooxygenase knock out mice. *Biochem. Pharmacol.*, **58**: 1237-1246
- Lavker, R.M. and Sun, T.-T. (1983) Epidermal stem cells. *J. Invest. Dermatol.*, **81**: 121S-127S
- Lecomte, M., Laneuville, O., Ji, C., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1994) Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J. Biol. Chem.*, **269**: 13207-13215
- Leder, C., Diplomarbeit, 1998
- Ledwith, B.J., Pauley, C.J., Wagner, L.K., Rokos, C.L., Alberts, D.W., and Manam, S. (1997) Induction of cyclooxygenase-2 expression by peroxisome proliferators and non-tetradecanoylphorbol 12,13-myristate-type tumor promoters in immortalized mouse liver cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 37070-3714
- Leslie, C.C. (1997) Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **272**: 16709-16712
- Lindner, G., Botchkarev, V.A., Botchkareva, N.V., Ling, G., van der Veen, C., and Paus, R. (1997) Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). *Am. J. Pathol.*, **151**: 1601-1617
- Li-Stiles, B., Lo, H.H., and Fisher, S.M. (1998) Identification and characterization of several forms of phospholipase A₂ in mouse epidermal keratinocytes. *J. Lipid Res.*, **39**: 569-582
- Lu, S., Tiekso, J., Hietanen, S., Syrjanen, K., Havu, V.K., and Syrjanen, S. (1999) Expression of cell-cycle proteins p53, p21 (WAF-1), PCNA and Ki-67 in benign, premalignant and malignant skin lesions with implicated HPV involvement. *Acta Derm. Venerol.*, **79**: 268-273
- Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C., and Browner, M.F. (1996) Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Natl. Struct. Biol.*, **3**: 927-933
- Maldve, R.E., Kim, Y., Muga, S.J., and Fischer, S.M. (2000) Prostaglandin E₂ regulation of cyclooxygenase expression in keratinocytes is mediated via cyclic nucleotide-linked prostaglandin receptors. *J. Lipid Res.*, **41**: 873-881
- Mancini, J.A., O'Neill, G.P., Bayly, C., and Vickers, P.J. (1994) Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis. *FEBS Lett.*, **342**: 33-77
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evans, R.M. (1995) The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*, **83**: 835-839
- Mao-Qiang, M., Jain, M., Feingold, K.R., and Elias, P.M. (1996) Secretory phospholipase A₂ activity is required for permeability barrier homeostasis. *J. Invest. Dermatol.*, **106**: 57-63
- Marekov, L.N. and Steinert, P.M. (1998) Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.*, **273**: 17763-17770
- Marks, F. (1999) Arachidonic acid and companions: An abundant source of biological signals. In: Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: From biogenesis to clinical application. Eds.: Marks, F. and Fürstenberger, G., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 1-46

- Marks, F. and Fürstenberger, G. (2000) Cancer chemoprevention through interruption of multistage carcinogenesis: The lessons learnt by comparing mouse skin carcinogenesis and human large bowel cancer. *Eur. J. Cancer*, **36**: 314-329
- Marnett, L.J. (1994) Generation of mutagens during arachidonic acid metabolism. *Cancer Metastasis Rev.*, **13**: 303-308
- Marnett, L.J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S., and Lanzo, C.A. (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. *J. Biol. Chem.*, **274**: 22903-22906
- Martin, C. and Ullrich, V. (1999) Prostanoid synthases. In: Prostaglandins, leukotrienes and other eicosanoids: From biogenesis to clinical application. Eds. Marks, F. and Fürstenberger, G., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp 89-108
- Masferrer, J.L., Zweifel, B.S., Manning, P.T., Hauser, S.D., Leahy, K.M., Smith, W.G., Isakson, P.C., and Seibert, K. (1994) Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and nonulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 3228-3232
- Masferrer, J.L., Leahy, K.M., Koki, A.T., Zweifel, B.S., Woerner, B.M., Edwards, D.A., Flickinger, A.G., Moore, R.J., and Seibert, K. (2000). Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer Res.*, **60**: 1306-1311
- Meade, E.A., Smith, W.L., and DeWitt, D.L. (1993) Expression of the murine prostaglandin (PGH) synthase-1 and PGH synthase-2 isoenzymes in cos-1 cells. *J. Lipid. Med.*, **6**: 119-129
- Meade, E.A., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (1999) Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **274**: 8328-8334
- Mehrel, T., Hohl, D., Rothnagel, J.A., Lognley, M.A., Bundman D., Cheng, C., Lichtl, U., Bisher, M.E., Alasdair, S.C., Steinert, P.M., Yuspa, S.H., and Roop, D.R. (1990) Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, Loricrin. *Cell*, **61**: 1103-1112
- Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J., and Needleman, P. (1988) Isolation and characterization of the complementary DNA from sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J. Biol. Chem.*, **263**: 3550-3553
- Millar, S. (1997) The role of patterning genes in epidermal differentiation. In: Cowin, P., Klymkowsky, M.W., eds., Cytoskeletal-membrane interactions and signal transduction. Molecular biology intelligence unit. Austin, Tex.: Landes Bioscience, pp. 87-102
- Mitchell, J.A. Larkion, S., and Williams, T.J. (1995) Cyclooxygenase-2: regulation and reöevance in inflammtion. *Biochem. Pharmacol.*, **50**: 1535-1542
- Moll, R., Franke, W.W., Schiller, D.L., Geiger, B., and Krepler, R. (1982) The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*, **31**: 11-24
- Moll, R. and Moll, I. (1998) Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch.*, **432**: 487-504
- Morham, S.G., Langenbach, R., Loftin, C.D., Tiano, H.F., Vouloumanos, N., Jennette, J.C., Mahler, J.F., Kluckman, K.D., Ledford, A., Lee, C.A., and Smithies, O. (1995) Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell*, **83**: 473-482

- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, **275**: 1787-1790
- Morris, R.J. and Potten, C.S. (1994) Slowly cycling (label-retaining) epidermal cells behave like clonogenic stem cells in vivo. *Cell Prolif.*, **27**: 279-289
- Morris, R.J. and Potten, C.S. (1999) Highly persistent label-retaining cells in the hair follicle of mice and their fate following induction of anagen. *J. Invest. Dermatol.*, **112**: 470-475
- Morrow, J.D. and Roberts, L.J. (1997) The isoprostanes: Unique bioactive products of lipid peroxidation. *Prog. Lipid. Res.*, **36**: 1-21
- Müller-Decker, K., Scholz, K., Marks, F., and Fürstenberger, G. (1995) Differential expression of prostaglandin H synthase isoenzymes during multistage carcinogenesis in mouse epidermis. *Molec. Carcinog.*, **12**: 31-41
- Müller-Decker, K., Scholz, K., Neufang, G., Marks, F., and Fürstenberger, G. (1998a) Localization of prostaglandin-H synthase-1 and -2 in mouse skin: Implications for cutaneous function. *Exp. Cell Res.*, **242**: 84-91
- Müller-Decker, K., Kopp-Schneider, A., Seibert, K., Marks, F., and Fürstenberger, G. (1998b) Localization of prostaglandin H synthase isoenzymes in murine epidermal tumors: Suppression of skin tumor promotion by inhibition of prostaglandin H synthase-2. *Molec. Carcinog.*, **23**: 36-44
- Müller-Decker, K., Reinerth, G., Krieg, P., Zimmermann, R., Heise, H., Bayerl, C., Marks, F., and Fürstenberger, G. (1999) Prostaglandin H synthase isoenzyme expression in normal and neoplastic human skin. *Int. J. Cancer*, **82**: 648-656
- Murakami, M., Nakatani, Y., and Kudo, I. (1996) Type II secretory phospholipase A₂ associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation. *J. Biol. Chem.*, **271**: 30041-30051
- Murakami, M., Kuwata, H., Amakasu, Y., Shimbara, S., Nakatani, Y., Atsumi, G., and Kudo, I. (1997) Prostaglandin E₂ amplifies cytosolic phospholipase A₂- and cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in mouse osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 18991-18997
- Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., and Kudo, I. (1999) Functional coupling between various phospholipase A₂s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J. Biol. Chem.*, **274**: 3103-3115
- Murakami, M., Naraba, H., Tanioka, T., Semmyo, N., Nakatani, Y., Kojima, F., Fueki, M., Ueno, A., Ohishi, S., and Kudo, I. (2000) Regulation of prostaglandin E₂ biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E₂ synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **275**: 32783-32792
- Mutsaers, J.H., van-Halbeek, H., Kamerling, J.P., and Vliegenhart, J.F. (1985) Determination of the structure of the carbohydrate chains of prostaglandin endoperoxide synthase from sheep. *Eur. J. Biochem.*, **147**: 569-574
- Nelson, M.J. and Seitz, S.P. (1994) The structure and function of lipoxygenases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **4**: 878-884
- Noltenius, J. (1987) Tumor Handbuch, Band 3, Pathologie und Klinik der menschlichen Tumore, Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore
- O'Banion, M.K. (1999) Cyclooxygenase-2. Molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit. Rev. Neurobiol.*, **13**: 45-82

- O'Brian, W.F. (1995) The role of prostaglandins in labor and delivery. *Clin. Perinatol.*, **22**: 973-984
- Odland, G.F. and Holbrook, K.A. (1981) The lamellar granules of epidermis. *Curr. Probl. Dermatol.*, **9**: 29-49
- O'Neill, G.P., Mancini, J.A., Kargman, S., Yergey, J., Kwan, M.Y., Falgoutret, J.P., Abramovitz, M., Kennedy, B.P., Oullet, M., Cromlish, W. et al. (1994) Overexpression of human prostaglandin G/H synthase-1 and -2 by recombinant vaccinia virus: Inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and biosynthesis of 15-hydroxyeicosatetraenoic acid. *Mol. Pharmacol.*, **45**: 245-254
- Onoe, Y., Miyaura, C., Kaminakayashiki, T., Nagai, Y., Noguchi, K., Chen, Q.R., Seo, H., Ohta, H., Nozawa, S., Kudo, I., and Suda, T. (1996) IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J. Immunol.*, **156**: 758-764
- Otto, J.C., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1993) N-Glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 their orientation in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **268**: 18234-18242
- Otto, J.C. and Smith, W.L. (1994) The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **269**: 19868-19875
- Otto, J.C. and Smith, W.L. (1995) Prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2. *J. Lipid Mediat. Cell Signal*, **12**: 139-1356
- Oshima, M., Dinchuk, J.E., Kargman, S.L., Oshima, H., Hancock, B., Kwong, E., Trzaskos, J.M., Evans, J.F., and Taketo, M.M. (1996) Suppression of intestinal polyposis in *Apc^{delta 716}* knock out mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell*, **87**: 803-809
- Pace-Asciak, C.R., Reynaud, D., and Demin, P. (1995) Mechanistic aspects of hepoxilin biosynthesis. *J. Lipid. Mediat. Cell Signal.*, **12**: 307-311
- Pang, L. and Hoult, J.R.S. (1997) Repression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by prostaglandin E₂ and other cyclic AMP stimulants in J774 macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, **53**: 493-500
- Parrett, M.L., Harris, R.E., Joarder, F.S., Ross, M.S., Clausen, K.P., and Robertson, F.M. (1997) Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int. J. Oncol.*, **10**: 503-507
- Patrignani, P., Panara, M.R., Greco, A., Fusco, P., Natoli, C., Iacobelli, S., Cipollone, F., Ganci, A., Creminon, C., and Macclouf, J. (1994) Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **271**: 1705-1712
- Paus, R., Menrad, A., and Czarnetzki, B.M. (1995) Nekrobiologie der Haut: Apoptose. *Hautarzt*, **46**: 185-303
- Paus, R. (1996) Control of the hair cycle and hair diseases as cycling disorders. *Curr. Opin. Dermatol.*, **3**: 248-258
- Paus, R. (1998) Principles of hair cycle control. *J. Dermatol.*, **25**: 793-802
- Paus, R., Müller-Röver, S., Van der Veen, C., Maurer, M., Eichmüller, S., Ling, G., Hofmann, U., Foitzik, K., Mecklenburg, L., and Handjiski, B. (1999a) A comprehensive guide for the recognition and classification of distinct stages of hair follicle morphogenesis. *J. Invest. Dermatol.*, **113**: 523-532
- Paus, R. and Cotsarelis, G. (1999b) The biology of hair follicle. *New Engl. J. Med.*, **341**: 491-497

- Pentland, A.P. and Needleman, P. (1986) Modulation of keratinocyte proliferation in vitro by endogenous prostaglandin synthesis. *J. Clin. Invest.*, **77**: 246-251
- Pentland, A.P., Schoggins, J.W., Scott, G.A., Khan, K.N.M., and Han, R.J. (1999) Reduction of UV-induced skin tumors in hairless mice by selective COX-2 inhibition. *Carcinogenesis*, **20**: 1939-1944
- Piazza, G.A., Rahm, A.L., Krutzsch, M., Sperl, G., Paranka, N.S., Gross, P.H., Brendel, K., Burt, R.W., Alberts, D.S., Pamukcu, R., and Ahnen, D.J. (1995) Antineoplastic drug sulindac sulfide and sulfone inhibit cell growth by inducing apoptosis. *Cancer Res.*, **55**: 3110-3116
- Picot, D. and Gravito, M. (1994) Prostaglandin H synthase: Implication for the membrane structure. *FEBS Lett.*, **346**: 21-25
- Picot, D., Loll, P.J., and Gravito, M. (1994) The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H₂ synthase-1. *Nature*, **367**: 242-249
- Pilbeam, C.C., Raisz, L.G., Voznesensky, O., Alander, C.B., Delman, B.N., and Kawaguchi (1995) Autoregulation of inducible prostaglandin G/H synthase in osteoblastic cells by prostaglandins. *J. Bone Mineral. Res.*, **10**: 406-414
- Pilbeam, C.C., Harrison, J.R., and Raisz, L.G. (1996) Prostaglandins and bone metabolism. In: Principles of Bone Biology. Eds.: Bilezikian, J., Raisz, L., and Rodan, G., Academic Press, New York, pp 715-728
- Piomelli, D. and Greengard, P. (1990) Lipoxigenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. *TiPS*, **11**: 367-373
- Polakowska, R.R. and Haake, A.R. (1994) Apoptosis: The skin from a new perspective. *Cell Death Diff.*, **1**: 19-31
- Powell, W.S. (1982) Rapid extraction of arachidonic acid metabolites from biological samples using octadecylsilyl silica. *Methods Enzymol.*, **86**: 467-477
- Prescott, S.M. (2000) Is cyclooxygenase the alpha and omega of cancer? *J. Clin. Invest.*, **11**: 1511-1513
- Ratuasinghe, D., Tangrea, J., Roth, J.M., Dawsey, S., Hu, N., Anver, M., Wang, Q.-H., and Taylor, P.R. (1999) Expression of cyclooxygenase-2 in human squamous cell carcinoma of the esophagus: an immunohistochemical survey. *Anticancer Res.*, **19**: 171-174
- Reddy, S.T. and Herschman, H.R. (1994) Ligand-induced synthesis requires expression of the TIS10/PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages. *J. Biol. Chem.*, **269**: 15473-15480
- Reynolds, J. A. and Jahoda, C.A. (1996) Hair matrix germinative epidermal cells confer follicle-inducing capabilities on dermal sheath and high passage papilla cells. *Development*, **122**: 3085-3094
- Rice, R.H. and Green, H. (1977) The cornified envelope of terminally differentiated human epidermal keratinocytes consists of cross linked proteins. *Cell*, **11**: 417-422
- Rice, R.H. and Green, H. (1979) Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: Activation of cross-linking by calcium ions. *Cell*, **11**: 417-422
- Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., and Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, **391**: 79-82
- Ristimäki, A., Honkanen, N., Jänkälä, H., Sipponen, P., and Härkönen, M. (1997) Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res.*, **57**: 1276-1280

- Roberts, M.F. (1996) Phospholipases: Structural and functional motifs for working at an interface. *FASEB J.*, **10**: 1159-1172
- Romeis, B. (1989) Mikroskopische Technik. Ed. Böck, P., Urban und Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore
- Roop, D.R., Huitfeld, H., Kilkenny, A., and Yuspa, S.H. (1987) Regulated expression of differentiation-associated keratins in cultured epidermal cells detected by monospecific antibodies to unique peptides of mouse epidermal keratins. *Differentiation*, **35**: 143-150
- Roop, D.R. (1995) Defects in the barrier. *Science*, **267**: 474-475
- Rosenberg, L., Palmer, J.R., Zauber, A.G., Warhauer, M.E., Stolley, P.D., and Shapiro, S. (1991) A hypothesis: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**: 355-358
- Rosenfield, R.L., Kentsis, A., Deplewski, D., and Ciletti, N. (1999) Rat preputial sebocyte differentiation involves peroxisome proliferator-activated receptors. *J. Invest. Dermatol.*, **112**: 226-232
- Ruggeri, B., Caamano, J., Goodrow, T., DiRado, M., Bianchi, A., Trono, D. Conti. C.J., and Klein-Szanto, A.J. (1991) Alteration of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res.*, **51**: 6615-6621
- Samuelson, B., Dahlen, S.E., Lindgren, J.A., Rouzer, C.A., and Serhan, C.N. (1993) Leukotrienes and lipoxines: structure, biosynthesis, and biological effects. *Science*, **237**: 171-1176
- Sanchez, T. and Moreno, J.J. (1999) Role of leukocyte influx in tissue prostaglandin H synthase-2 overexpression induced by phorbol ester and arachidonic acid in skin. *Biochem. Pharmacol.*, **58**: 877-879
- Sawaoka, H., Tsuji, S., Tsujii, M., Gunawan, E.S., Sasaki, Y., Kawano, S., and Hori, M. (1999) Cyclooxygenase inhibitors suppress angiogenesis and reduce tumor growth in vivo. *Lab. Invest.*, **79**: 1469-1477
- Schafer, A.I. (1995) Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J. Clin. Pharmacol.*, **35**: 214-227
- Scher, R. and Daniel, C.R. (1990) In: Nails: Therapy, diagnosis, surgery. Saunders, Philadelphia
- Scholz, K., Fürstenberger, G., Müller-Decker, K., and Marks, F. (1995) Differential expression of prostaglandin-H-synthase isoenzymes in normal and activated keratinocytes in vivo and in vitro. *Biochem. J.*, **309**: 263-268
- Schwartzman, M.L. and McGiff, M. (1995) Renal cytochrome P450. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.*, **12**: 229-242
- Schweizer, J. and Marks, F. (1977) A developmental study of the distribution and frequency of Langerhans cells in relation to formation of patterning in mouse tail epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, **69**: 198-294
- Schweizer, J. (1977) Neogenesis of functional hair follicles in adult mouse skin selectively induced by tumor-promoting phorbol esters. *Experientia*, **15**: 1651-1653
- Schweizer, J. (1993) Murine epidermal keratins. In: Molecular biology of the skin: The keratinocyte. Academic Press. San Diego, pp 33-77
- Schweizer, J. and Winter, H. (1982) Keratin polypeptide analysis in fetal and terminally differentiating newborn mouse epidermis. *Differentiation*, **22**: 19-24
- Scribner, J.D. and Süß, R. (1987) In: International Review of Experimental Pathology. Eds.: Richter, G.W. and Epstein, M.A., Academic Press, NY, **18**: 137-198

- Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L., and Isakson, P. (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 12013-12017
- Shaw, G. and Kamen, R. (1986) A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, **46**: 659-667
- Sheng, H., Shao, J., Dixon, D.A., Williams, C.S., Prescott, S.M., DuBois, R.N., Beauchamp, R.D. (2000) Transforming growth factor- β 1 enhances Ha-ras-induced expression of cyclooxygenase-2 in intestinal epithelial cells via stabilization of mRNA. *J. Biol. Chem.*, **275**: 6628-6635
- Sengel, P. (1990) Pattern formation in skin development. *Int. J. Dev. Biol.*, **34**: 33-50
- Setälä, K., Merenmies, L., Stjernvall, L., and Nyholm, M. (1960) Mechanism of experimental tumorigenesis. IV. Ultrastructure of interfollicular epidermis of normal adult mouse. *J. Natl. Cancer Inst.*, **24**: 329-353.
- Sirios, J. and Richards, J.S. (1992) Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles in vivo. *J. Biol. Chem.*, **267**: 6382-6388
- Sirios, J. and Richards, J.S. (1993) Transcriptional regulation of the promotor of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. *J. Biol. Chem.*, **268**: 21931-21938
- Smith, W.L. and Bell, T.G. (1978) Immunohistochemical localization of prostaglandin forming cyclooxygenase in renal cortex. *Am. J. Physiol.*, **235**: F541-F547
- Smith, W.L. and Marnett, L.J. (1994) Prostaglandin endoperoxide synthase. In: Metal Ions in Biological Systems. Eds.: Sigel, H., and Sigel, A., Dekker, New York, vol. 30, pp 163-199
- Smith, W.L., DeWitt, D.L., and Garavito, R.M. (2000) Cyclooxygenase: structural, cellular and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.*, **69**: 145-182
- St. Jaques, B., Dassel, H.R., Karavanova, I., Botchkarev, V.A, Li, J., Danielan, P.S., McMahon, J.A., Lewis, P.M., Paus, R., and McMahon, A.P. (1998) Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr. Biol.*, **8**: 1058-1068
- Steinbach, G., Lynch, P.M., Phillips, R.K.S., Wallace, M.H., Hawk, E., Gordon, G.B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L.-K., Levin, B. Godio, L., Patterson, S., Rodriguez-Bigas, M.A., Jester, S.L., King, K.L., Schumacher, M., Abbruzzese, J., DuBois, R.N., Hittelman, W.N., Zimmerman, S., Sherman, J.W., and Kelloff, G. (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.*, **342**: 1946-1952
- Steinert, P.M., Steven, A.C., and Roop, D.R. (1985) The molecular biology of intermediate filaments. *Cell*, **42**: 411-420
- Steinert, P.M. and Marekov, L.N. (1995) The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross linked components of the human epidermal keratinocyte cornified envelope. *J. Biol. Chem.*, **270**: 17702-17711
- Straile, W.E., Chase, H.B., and Arsenault, C. (1961) Growth and differentiation of hair follicles between periods of activity and quiescence. *J. Exp. Zool.*, **148**: 205-216
- Stüttgen, G. and Schaefer, H. (1974) Talgsekretion. In: Funktionelle Dermatologie, Springer Verlag, pp. 170-171

- Su, B. and Karin, M. (1996) Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr. Opin. Immunol.*, **8**: 402-411
- Subbaramaiah, K., Altorki, N., Chung, W.J., Mestres, J.R., Sampat, A., and Dannenberg, A.J. (1999) Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53. *J. Biol. Chem.*, **274**: 10911-110915
- Subbaramaiah, K., Lin, D.T., Hart, J.C., and Dannenberg, A.J. (2001) Peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands suppress the transcriptional activation of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.*, **276**: 12440-12448
- Suskind, R.K. (1951) The chemistry of the human sebaceous gland: I. Histochemical observation. *J. Invest. Dermatol.*, **17**: 37-49
- Takahashi, Y., Taketani, Y., Endo, T., Yamamoto, S., and Kumegawa, M. (1994) Studies on the induction of cyclooxygenase isozymes by various prostaglandins in mouse osteoblastic cell line with reference to signal transduction pathways. *Biochem. Biophys. Acta*, **1212**: 217-224
- Tanioka, T., Nakatani, Y., Semmyo, N., Murkami, M., and Kudo, I. (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E_2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E_2 biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **275**: 32775-32782
- Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J. Sun, T.-T., and Lavker, R.M. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*, **102**: 451-461
- Tazawa, R., Xu, X.M., Wu, K.K., and Wang, L.H. (1994) Characterization of the genomic structure, chromosomal location, and promoter of human prostaglandin H synthase-2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **203**: 190-199
- Thompson, H.J., Jiang, C., Lu, J.X., Mehta, R.G., Piazza, G.A., Paranka, N.S., Pamukcu, R., and Ahnen, D.J. (1997) Sulfone metabolite of sulindac inhibits mammary carcinogenesis. *Cancer Res.*, **57**: 267-271
- Thun, M.J., Namboodiri, M.M., and Heath, C.W.J. (1991) Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.*, **325**: 1322-1327
- Tischfield, J.A. (1997) A reassessment of the low molecular weight phospholipase A_2 gene family in mammals. *J. Biol. Chem.*, **272**: 17247-17250
- Tjandrawinata, R.R., Dahiya, R., and Hughes-Ford, M. (1997) Induction of cyclooxygenase-2 mRNA by prostaglandin E_2 in human prostatic carcinoma cells. *Br. J. Cancer*, **75**: 1111-1118
- Tomlison, A., Appleton, I., Moore, A.R., Gilroy, D.W., Willis, D., Mitchell, J.A., and Willoughby, D.A. (1994) Cyclooxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. *Br. J. Pharmacol.*, **113**: 693-698
- Tsuji, M. and DuBois, R.N. (1995) Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell*, **83**: 493-501
- Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R.N. (1998) Cyclooxygenase-2 regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*, **93**: 705-716
- Vane, J.R., Mitchell, J.A., Appleton, I., Tomlinson, A., Bishop-Bailey, D., Croxtall, J., and Willoughby, D.A. (1994) Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 2046-2050

- Vromen, H.E., Nemecek, R.A., and Hsia, S.L. (1969) Synthesis of lipids from acetate by human preputial and abnormal skin in vitro. *J. Lipid Res.*, **10**: 507-514
- Wang, H.Q. and Smart, R.C. (1999) Overexpression of protein kinase C α in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2, and TNF α expression but not in tumor promotion. *J. Cell Science*, **112**: 3497-3506
- Weedon, D. and Strutton, G. (1981) Apoptosis as the mechanism of the involution of hair follicles in catagen formation. *Acta Derm. Venerol. (Stockholm)*, **61**: 335-341
- Weiss, L.W. and Zelikson, A.S. (1975) Embriology of the epidermis: Ultrastructural aspects. *Acta Dermatovener.*, **55**: 431-442
- Williams, C.S., Luongo, C., Radhika, A., Zhang, T., Lamps, L.W., Nanney, L.B., Beachamp, R.D., and DuBois, R.N. (1996) Elevated cyclooxygenase-2 levels in min mouse adenomas. *Gastroenterology*, **111**: 1134-1140
- Williams, C.S., Tsujii, M., Reese, J., Dey, S.K., and DuBois, R.N. (2000) Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth. *J. Clin. Invest.*, **105**: 1589-1594
- Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., and Ristimäki, A. (1998) Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res.*, **58**: 4997-5001
- Wong, E., Bayly, C., Waterman H.L., Riendeau, D., and Mancini, J.A. (1997a) Conversion of prostaglandin G/H synthase-1 into an enzyme sensitive to PGHS-2-selective inhibitors by a double His⁵¹³ to Arg and Ile⁵²³ to Val mutation. *J. Biol. Chem.*, **272**: 9280-9286
- Wong, E., DeLuca, C., Boily, C., Charleston, S., Cromlish, W., Denis, S., Kargman, S., Kennedy, B.P., Ouellet, M., Skorey, K., O'Neill, G.P., Vickers, P.J., and Riedeau, D. (1997b) Characterization of autocrine inducible prostaglandin H synthase (PGHS-2) in human osteosarcoma cells. *Inflamm. Res.*, **46**: 51-59
- Yamagata, K., Andreasson, K., Kaufmann, W., Barnes, C., and Worley, P. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, **11**: 371-386
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, **407**: 242-248
- Yansey, K.B. (1995) Adhesion molecules. II. Interactions of keratinocytes with epidermal basement membrane. *J. Invest. Dermatol.*, **104**: 1008-1014
- Yokoyama, C., Takai, T., and Tanabe, T. (1988) Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett.*, **25**: 347-351
- Yu, K., Bayona, W., Kallen, C.B., Hardings, H.P., Ravera, P.C., McMahon, G., Brown, M., and Mitchell, A.L. (1995) Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J. Biol. Chem.*, **270**: 23975-23983
- Zhang, F., Subbaramaiah, K., Altroki, N., and Dannenberg, A.J. (1998) Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase 2. *J. Biol. Chem.*, **273**: 2424-2436
- Zhou, P., Byrne, C., Jacobs, J., and Fuchs, E. (1995) Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes Dev.*, **9**: 700-713
- Ziboh, V.A. (1994) Essential fatty acids/eicosanoid biosynthesis in the skin: Modulators of arachidonic acid release from phosphatidylcholine. *Biochem. J.*, **184**: 283-290

8 Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Die verwendeten Einheiten entsprechen dem internationalen Standard (SI-Einheiten)

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
Ac	Aceton
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bq	Becquerel
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
Ci	Curie
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase A ₂
cpm	„counts per minute“, Signale pro Minute
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMBA	Dimethylbenz(a)anthracen
DNA	Desoxiribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
E-BSA	Rinderserumalbumin, ELISA-Qualität
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EIA	Enzym-Immun-Assay
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis coli
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor
FKS	Fötale Kälberserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
g	Gramm
h	„hour“, Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
Hf	Haarfollikel
ICH	Immunhistochemie
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
Inh	Inhibitor
K 5	Keratin 5
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Ko	Kontrolle

LH	luteinisierendes Hormon
LOX	Lipoxygenase
LPS	bakterielles Lipopolysaccharid
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
Me	Methanol
MEM	Minimales essentielles Medium
min	Minute
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	„Messenger ribonucleic acid“, Boten RNA
NF-κB	„nuclear factor“, Kernfaktor-Kappa-B
NK	Negativkontrolle
NSAID	nicht-steroidales anti-inflammatorisches Agens
OD	optische Dichte
pA	Polyadenylierungssequenz
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Dulbecos phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung
PCR	„Polymerase Chain Reaction“, Polymerase Kettenreaktion
PDGF	„platelet derived growth factor“, Blutplättchen Wachstumsfaktor
PG	Prostaglandin
PK	Positivkontrolle
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisomaler Proliferator-aktivierter Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
Taq	Thermophilus aquaticus
TEMED	N'-N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
tr	transgen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tx	Thromboxan
U	„unit“, Enzymeinheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolette Strahlung
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
wt	Wildtyp

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. F. Marks für die Überlassung des Themas und seine stetige Gesprächsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. W. Müller danke ich für die Übernahme des Referats und Herrn Prof. K. Resch für die Betreuung der Arbeit am Fachbereich Chemie der Universität Hannover.

Ich danke Herrn Dr. G. Fürstenberger für sein Interesse am Fortschritt dieser Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Frau PD Dr. K. Müller-Decker gilt mein besonderer Dank für ihre engagierte Betreuung, ihre ständige Gesprächsbereitschaft und Unterstützung, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. U. Klotz spreche ich meinen Dank für die Durchführung der Mikroinjektion und Herrn W. Henrich für die Zucht der Tiere im Zentralen Tierlabor des DKFZ aus.

Herrn Prof. Dr. K. Goerttler sowie Herrn Prof. Dr. H.-J. Gröne und Mitarbeitern danke ich für die pathologischen Begutachtungen.

Herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Frau B. Steinbauer, Frau A. Pohl-Arnold und Frau D. Kucher danke ich sehr für die Tierzucht und die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche. Bei Frau U. Beckhaus und Frau I. Vogt bedanke ich mich für die Anfertigung der sehr guten Gewebeschnitte.

Sandra Pfrang danke ich recht herzlich für die engagierte und effektive Zusammenarbeit. Corinna Bähr, Sabine Häusermann, Markus Heidt, Gaby Kollender, Karsten Müller und Malte Siebert danke ich für die ausgiebigen Diskussionen und wertvollen Anregungen.

Vor allem aber bedanke ich mich recht herzlich bei meiner Familie für das Interesse und die tatkräftige Unterstützung während meiner Promotion und meines gesamten Studiums.

Lebenslauf

Name, Vorname	Neufang, Gitta
Anschrift	Bergheimer Str. 136 69115 Heidelberg
Geburtstag/ -ort	23.01.1973 in Ludwigshafen am Rhein
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1979 bis 1983	Grundschule in Ludwigshafen am Rhein
1983 bis 1992	Geschwister-Scholl-Gymnasium in Ludwigshafen am Rhein
Juni 1992	Allgemeine Hochschulreife

Wissenschaftliche Ausbildung

Oktober 1992	Beginn des Studiums der Biochemie, Universität Hannover
Oktober 1994	Diplomvorprüfung
Mai 1997	Diplomprüfung Hauptfächer: Biochemie, Biophysikalische Chemie Nebenfach: Immunologie
Mai – November 1997	Diplomarbeit in der Abteilung „Biochemie der gewebsspezifischen Regulation“ von Prof. Dr. F. Marks am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg: „Subzelluläre Verteilung und funktionelle Charakterisierung von Prostaglandin H Synthase-2 in Mauskeratinozyten“
Seit Januar 1998	Dissertation in der Abteilung „Biochemie der gewebsspezifischen Regulation“ von Prof. Dr. F. Marks am DKFZ, Heidelberg

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt, nur die erwähnten Hilfsmittel benutzt und die zur Hilfeleistung herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Diese Arbeit wurde nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Weiterhin erkläre ich, daß die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Gitta Neufang